



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-
CIRÚRGICAS**

LEOCÁCIO VENÍCIUS DE SOUSA BARROSO

**ANÁLISE DO IMPACTO DA CAPTAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES
TESTICULARES NA FUNÇÃO GONADAL E ERÉTIL DE ANIMAIS SUBMETIDOS
A ORQUIDOPEXIA EXPERIMENTAL: COMPARAÇÃO DA TÉCNICA DE
EXTRAÇÃO CONVENCIONAL COM A ASPIRATIVA**

FORTALEZA

2015

LEOCÁCIO VENÍCIUS DE SOUSA BARROSO

**ANÁLISE DO IMPACTO DA CAPTAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES
TESTICULARES NA FUNÇÃO GONADAL E ERÉTIL DE ANIMAIS SUBMETIDOS
A ORQUIDOPEXIA EXPERIMENTAL: COMPARAÇÃO DA TÉCNICA DE
EXTRAÇÃO CONVENCIONAL COM A ASPIRATIVA**

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

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Flávio
Gonzaga Silva

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Reges
Maia de Oliveira

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- B285a Barroso, LeocácioVenícius de Sousa.
Análise do impacto da captação de espermatozoides testiculares na função gonadal e erétil de animais submetidos a orquidopexia experimental: comparação da técnica de extração convencional com a aspirativa./LeocácioVenícius de Sousa Barroso. – 2015.
80 f.: il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Doutorado em Cirurgia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular no Estresse.
Orientação: Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva.
1. Fertilidade. 2. Infertilidade Masculina. 3. Testosterona. 4. Hipogonadismo. I. Título.

CDD 617.46

LEOCÁCIO VENÍCIUS DE SOUSA BARROSO

**ANÁLISE DO IMPACTO DA CAPTAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES
TESTICULARES NA FUNÇÃO GONADAL E ERÉTIL DE ANIMAIS SUBMETIDOS
A ORQUIDOPEXIA EXPERIMENTAL: COMPARAÇÃO DA TÉCNICA DE
EXTRAÇÃO CONVENCIONAL COM A ASPIRATIVA**

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

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Sidney Glina
Faculdade de Medicina do ABC- SP

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará- UECE

Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros
Universidade Federal do Ceará-UFC

AGRADECIMENTOS

A Deus, ser supremo, Senhor da vida, Criador do Universo, que por seu amor e misericórdia me abraça como filho único e especial.

Aos meus pais, por fazerem parte do plano de Deus na minha vida, e me amarem de forma incondicional.

À minha esposa Verônica, por ser minha companheira que me completa, a pessoa que Deus me presenteou para exercer este sacramento tão belo que é o matrimônio.

Aos meus filhos, que se esforçam para entender meus momentos de ausência, mas, que são fonte de motivação na minha vida.

Ao Prof. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, professor titular do Departamento de Cirurgia e coordenador do Programa de Pós-graduação em cirurgia da Universidade Federal do Ceará (UFC), por seu empenho em sempre melhorar o nível da Pós-Graduação desta Universidade.

Ao Prof. Dr. MANOEL ODORICO DE MORAES FILHO, professor titular do Departamento de Farmacologia (UFC), por disponibilizar o Laboratório de Experimentação Animal para realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. LÚCIO FLÁVIO GONZAGA SILVA, professor de Urologia do Departamento de Cirurgia (UFC), orientador desta tese, por ser o criador desta linha de pesquisa em urologia, que servirá de base para o desenvolvimento científico e técnico de muitos urologistas.

Ao Prof. Dr. RICARDO REGES MAIA DE OLIVEIRA, professor de Urologia do Departamento de Cirurgia (UFC), co-orientador desta tese, por ter sido o grande incentivador de meu ingresso na Pós-Graduação, além de sua disponibilidade e entusiasmo no ensino e pesquisa desta instituição.

Ao Dr. FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU, coordenador do laboratório de cirurgia experimental desta instituição, pesquisador, estatístico, por sua contribuição na idealização deste estudo, além de múltiplas orientações, e realização da análise estatística desta tese.

À prof. Dra. FABÍOLA (Departamento de Farmacologia - UNICAMP) e à RENATA (pós-graduanda em Farmacologia-UNICAMP) pelas orientações quanto ao ensinado método de estímulo do nervo cavernoso do rato *in vivo*.

Ao Prof. Dr. JOÃO BATISTA GADELHA CERQUEIRA, Dr. ROMMEL PRATA REGADAS e Dr. DANIEL OLIVEIRA, pelas contribuições na qualificação desta Tese.

Ao Prof. Dr. FRANCISCO DAS CHAGAS MEDEIROS, professor de Ginecologia e Obstetrícia do Departamento de Saúde Materno-Infantil, por suas orientações gerais no manuseio de animais de laboratório.

À Prof. Dra. MARIA ANGELINA DA SILVA MEDEIROS, professora da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), responsável pelo processamento do tecido testicular extraído.

À Sra. MARIA DE NAZARÉ DE MOURA ROCHA, farmacêutica do laboratório de análises clínicas da UFC, responsável pela análise da concentração sérica de testosterona nos ratos estudados.

À Sra. VILANI, técnica do Departamento de Farmacologia, responsável pela coleta de sangue dos ratos.

Aos Srs. BENTO e TANCREDO, técnicos do laboratório de experimentação animal da UFC, responsáveis pela manutenção e cuidados com os animais estudados.

Ao estudante de Medicina RAFAEL JORGE ALVES DE ALCÂNTARA, brilhante futuro médico, pela preciosa contribuição na realização dos experimentos.

Aos companheiros do serviço de Urologia do HUWC (UFC), Dr. PAULO HENRIQUE M. REIS e Dr. ALEXANDRE SABÓIA, pelo incentivo, motivação e convívio.

Aos companheiros da clínica privada Dr. PARSIFAL BOTELHO, urologista, Dr. PAULO HENRIQUE e Dr. ALUISSON LIMA, anestesistas, pelo convívio quase diário nas cirurgias.

A todos que fazem parte do CENTRO DE MEDICINA REPRODUTIVA (BIOS) pelo convívio e incentivo.

Ao Sr. JOÃO TARCÍSIO DOS SANTOS, técnico em eletrônica, responsável pela criação do micromanipulador utilizado nos procedimentos experimentais.

As Sras. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA E MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, secretárias da Pós-graduação em cirurgia, pela atenção e apoio.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA -	análise de variância
AUC -	área sob a curva
CEPA -	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
cGMP -	guanosina cíclica monofosfato
COBEA -	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DE -	disfunção erétil
FSH -	hormônio folículo estimulante
FIV -	fertilização in vitro
GnRH -	Fator Liberador de Gonadotrofina Coriônica
hCG -	gonadotrofina coriônica humana
IC-	infertilidade conjugal
ICP -	pressão intracavernosa
ICSI -	injeção intra-citoplasmática de espermatozoides
IGF-1 -	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IIEF-5 -	Índice Internacional de Função Erétil-5
MAP-	pressão arterial média
MICRO-TESE-	extração testicular de espermatozoides utilizando microscópio
NO -	óxido nítrico
nNOS -	óxido nítrico sintase neuronal
PDE5 -	fosfodiesterase 5
PESA -	aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo
PET-	tomografia com emissão de pósitron
SHBG -	Globulina Transportadora de Hormônio Sexual
TESA -	aspiração percutânea testicular
TESE -	extração espermática testicular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Extração cirúrgica de espermatozoides	39
Figura 2 -	Aspiração de espermatozoides	39
Figura 3 -	Nervo cavernoso.....	41
Figura 4 -	Alterações de tensão (sistema PowerLab™).....	41
Figura 5 -	Câmara de Makler	42
Figura 6 -	Seio retro-orbital	43
Figura 7 -	Túbulo seminífero normal (com elementos da espermatogênese preservados) HE 400x	45
Figura 8 -	Histologia (14 dias de orquidopexia). Elementos celulares da espermatogênese encontram-se diminuídos em quantidade. HE 400x.....	46
Figura 9 -	Concentração sérica de testosterona mensurada imediatamente antes (D0) e 15 dias após a realização da orquidopexia (D15) nos mesmos ratos(GRUPO 4).....	47
Figura 10 -	Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos não operados (GRUPO 1) e em animais submetidos a orquidopexia, 15 dias após a operação (GRUPO 2 e 3).	47
Figura 11 -	Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos não operados (GRUPO 1)(D0) e em animais submetidos a orquidopexia e, posteriormente, a aspiração de espermatozoides do testículo (GRUPO 3) (D23)	48
Figura 12 -	Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos submetidos a orquidopexia(GRUPO 4), 15 dias após a operação, e em animais submetidos a orquidopexia, e, subsequentemente, a aspiração de espermatozóides do testículo, 8 dias após o procedimento(GRUPO 3) (D23)	48
Figura 13 -	Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos não operados(GRUPO 1)(D0) e em animais submetidos a orquidopexia e, posteriormente, a extração de espermatozoides do testículo(GRUPO 2) (D23)	49

Figura 14 - Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos submetidos a orquidopexia, 15 dias após a operação, e em animais submetidos a orquidopexia, e, subsequentemente, a extração de espermatozoides do testículo (D23)	49
Figura 15 - Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos não operados(D0) e em animais submetidos a orquidopexia e, posteriormente, a operação simulada de captação de espermatozoides do testículo (Simulado)(D23)	50
Figura 16 - Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a operação simulada de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), a aspiração de espermatozoides do testículo ou a extração de espermatozoides do testículo, 8 dias após o procedimento	51
Figura 17 - Número bruto de espermatozoides captados pelas técnicas de aspiração e extração	51
Figura 18 - Peso do tecido testicular, em gramas, captado pelas técnicas de aspiração e extração	52
Figura 19 - Avaliação da resposta erétil, por meio do cálculo da razão entre a pressão intracavernosa (PIC) e a pressão arterial média (PAM), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos não operados e em animais submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), 8 dias após a operação de orquidopexia	53
Figura 20 - Avaliação global da resposta erétil, por meio da determinação da área sob a curva (ASC, expressa em mmHg.s) da pressão intracavernosa (PIC, em mmHg) versus o tempo (segundos), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos não operados e em animais submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), 8 dias após a operação de orquidopexia	55

- Figura 21 - Avaliação da resposta erétil, por meio do cálculo da razão entre a pressão intracavernosa (PIC) e a pressão arterial média (PAM), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), a aspiração de espermatozoides do testículo e a extração de espermatozoides do testículo, 8 dias após a operação de orquidopexia 56
- Figura 22 - Avaliação global da resposta erétil, por meio da determinação da área sob a curva (ASC, expressa em mmHg.s) da pressão intracavernosa (PIC, em mmHg) versus o tempo (segundos), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), a aspiração de espermatozoides do testículo e a extração de espermatozoides do testículo, 8 dias após a operação de orquidopexia 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Desenho do Estudo	38
Tabela 2 -	Avaliação da resposta erétil, por meio do cálculo da razão entre a pressão intracavernosa (PIC) e a pressão arterial média (PAM), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos não operados e em animais submetidos a orquidopexia e, subseqüentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), 8 dias após a operação de orquidopexia....	53
Tabela 3 -	Avaliação global da resposta erétil, por meio da determinação da área sob a curva (ASC, expressa em mmHg.s) da pressão intracavernosa (PIC, em mmHg) versus o tempo (segundos), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos não operados e em animais submetidos a orquidopexia e, subseqüentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), 8 dias após a operação de orquidopexia....	54
Tabela 4 -	Avaliação da resposta erétil, por meio do cálculo da razão entre a pressão intracavernosa (PIC) e a pressão arterial média (PAM), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos submetidos a orquidopexia e, subseqüentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), a aspiração de espermatozoides do testículo e a extração de espermatozoides do testículo, 8 dias após a operação de orquidopexia.....	56

Tabela 5 - Avaliação global da resposta erétil, por meio da determinação da área sob a curva (ASC, expressa em mmHg.s) da pressão intracavernosa (PIC, em mmHg) versus o tempo (segundos), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), a aspiração de espermatozoides do testículo e a extração de espermatozoides do testículo, 8 dias após a operação de orquidopexia 57

RESUMO

O desenvolvimento da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) como técnica de reprodução assistida foi um grande avanço no tratamento da causa masculina de infertilidade. Em consequência da ICSI a biópsia testicular é feita não apenas para avaliar espermatogênese, mas também para captar espermatozoides. Este estudo tem por objetivo comparar o impacto da técnica de extração convencional com a aspirativa para captação de espermatozoides nas função gonadal e erétil de ratos com testículos orquidopéxicos. Estudo piloto para verificar o dano causado pela orquidopexia foi realizado inicialmente em seis ratos. Em seguida 26 ratos foram randomizados em 4 GRUPOS: GRUPO 1 (n=6)-Ratos intactos (não operados) foram submetidos à dosagem de testosterona e no dia seguinte a monitorização da pressão intra-cavernosa; GRUPO 2 (n=7) -No início os animais foram submetidos à orquidopexia experimental. Quinze dias após orquidopexia, os animais foram submetidos à dosagem de testosterona e no dia seguinte à captação de espermatozoides. Após período de uma semana, dosado novamente a testosterona seguido de monitorização da pressão intra-cavernosa no dia seguinte; GRUPO 3 (n=7) - Inicialmente, os animais foram submetidos a orquidopexia experimental. Quinze dias após orquidopexia, os animais foram submetidos à dosagem de testosterona e no dia seguinte à aspiração de espermatozoides testiculares. Após período de uma semana, dosado novamente a testosterona seguido de monitorização da pressão intra-cavernosa no dia seguinte; GRUPO 4 (n=6) - Foi dosado a testosterona dos animais no início do estudo seguido de orquidopexia. Após quinze dias, feita nova dosagem de testosterona. No dia seguinte foi realizado um procedimento simulado. Uma semana depois os ratos foram submetidos a nova dosagem de testosterona e no dia seguinte à monitorização da pressão intra-cavernosa . Foi considerado como significativo $P < 0,05$ (5%). Comparações entre os GRUPOS foram feitos com teste t, ANOVA e Tukey. Em relação ao dano à espermatogênese, 15 dias de orquidopexia foi suficiente para causar dano testicular. Em relação ao efeito da orquidopexia na função hormonal não foi observada diferença significativa ($p=0,4446$) comparando a testosterona na linha de base (D0) $4,58 \pm 1,44$ ng/ml com a testosterona no fim do experimento (D15) $4,99 \pm 1,96$ ng/ml). Não se observou diferença significativa ($p=0,4446$) comparando a concentração sérica da testosterona mensurada dos ratos

submetidos a orquidopexia (nos GRUPOS 2 e 3) ($6,66 \pm 4,67$ ng/ml) com os animais do GRUPO 1 (não operados) ($4,75 \pm 1,45$ ng/ml). Não houve impacto na testosterona dos animais submetidos à aspiração de espermatozoides e orquidopexia (Grupo 3) ($3,96 \pm 0,80$ ng/ml) comparado aos animais não operados (Grupo 1) ($4,75 \pm 1,45$ ng/ml) $p= 0,27$. Da mesma forma, não houve diferença significativa ($P = 0,2625$) na testosterona dos ratos submetidos a orquidopexia e aspiração Grupo 3 ($3,96 \pm 0,80$ ng/ml) comparando-se com os animais submetidos à orquidopexia isolada Grupo 4 ($4,99 \pm 1,96$ ng/ml) $p=0,26$. A captação cirúrgica de espermatozoides não causou hipogonadismo nos animais orquidopéxicos. Testosterona do Grupo 2 (orquidopexia e extração) e os animais não operados Grupo 1 foram ($5,35 \pm 4,65$ ng/ml) e ($4,75 \pm 1,45$ ng/ml), respectivamente $p=0,76$. Também não houve diferença na testosterona dos animais orquidopexia e extração ($5,35 \pm 4,65$ ng/ml) comparada com os animais submetidos a orquidopexia isolada ($4,99 \pm 1,96$ ng/ml) $p=0,86$. Não houve diferença significativa comparando a testosterona do Grupo Sham Grupo 4 ($3,70 \pm 1,27$ ng/ml), ratos submetidos a orquidopexia e operação simulada de captação de espermatozoides do testículo, com os animais não operados ($4,75 \pm 1,45$ ng/ml) $p=0,21$. O número absoluto de espermatozoides captados pela técnica de extração ($41,00 \pm 7,01$) foi significativamente maior que o número de espermatozoides obtidos pela técnica de aspiração ($21,33 \pm 8,14$) $p=0,0012$. O peso do tecido testicular obtido pela técnica de extração ($0,09 \pm 0,02$ g) foi significativamente maior que aquele obtido pela técnica de aspiração ($0,04 \pm 0,04$ g) $p=0,0452$. Em relação aos efeitos da captação de espermatozoides na função erétil não foi observado diferença significativa comparando os Grupos 1 e 4 em relação à razão PIC/PAM (pressão intracavernosa/pressão arterial média), e em relação a ASC (área sob a curva) em nenhuma das frequências avaliadas (2,4,6,8,10Hz). Não houve diferença significativa comparando os Grupos 2, 3 e 4 em relação à razão PIC/PAM e ASC em nenhuma das frequências avaliadas (2,4,6,8,10Hz). Em conclusão, a captação de espermatozoides do testículo de ratos orquidopéxicos seja por técnica de extração ou aspiração não alterou a função gonadal e erétil do animal. A quantidade de espermatozoides captados na técnica de extração foi maior que na técnica aspirativa.

Palavras-chave: Fertilidade. Testosterona. Hipogonadismo. Funçãoerétil. Ratos.

ABSTRACT

The development of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and assisted reproductive technology was a major breakthrough in the treatment of male infertility causes. Consequently ICSI testicular biopsy is done not only to evaluate spermatogenesis, but also to capture spermatozoa. This study aims to compare the impact of conventional extraction technique with aspiration for sperm retrieval in gonadal and erectile function in rats with orchidopexy testicles. Pilot study to determine the damage caused by orchidopexy was initially performed in six rats. Then 26 rats were randomized into 4 groups: Group 1 (n = 6) - Rats intact (non-operated) underwent dosage of testosterone and the next day monitoring of intra-cavernous pressure; Group 2 (n = 7) -At first the animals were subjected to experimental orchidopexy. Fifteen days after orchidopexy, the animals were subjected to testosterone dosage and the next day the sperm retrieval. After one week period, testosterone dosed again followed by monitoring of intra-cavernous pressure the following day; Group 3 (n = 7) - Initially, the animals were subjected to experimental orchidopexy. Fifteen days after, animals were subjected to determination of testosterone and the day after subjected to testicular sperm extraction. After one week period, testosterone was dosed again and followed by monitoring of intra-cavernous pressure; Group 4 (n = 6) - testosterone was dosed at study entry and followed by orchidopexia. Fifteen days later made new dosage testosterone. On the next day we performed a sham procedure. One week later the rats were subjected to the assay of testosterone and the next day the monitoring of intra-cavernous pressure. Was considered significant $P < 0.05$ (5%). Comparisons between groups were made with t-test, ANOVA and Tukey. Regarding the damage to spermatogenesis, 15 days orchidopexia was enough to cause testicular damage. Regarding the effect of hormone function in orchidopexic rats there was no significant difference ($p = 0.4446$) compared to testosterone at baseline (D0) 4.58 ± 1.44 ng/ml with testosterone at the end of the experiment (D15) 4.99 ± 1.96 ng/ml). There was no significant difference ($p = 0.4446$) comparing the serum concentration of testosterone measured in rats submitted to orchidopexy (in GROUPS 2:03) (6.66 ± 4.67 ng/ml) with the animals of group 1 (not operated) (4.75 ± 1.45 ng/ml). There was no impact of testosterone in animals subjected to suction and sperm orchidopexy (Group 3) ($\pm 3.96. 0.80$ ng/ml) compared to non-operated animals (Group 1) (4.75 ± 1.45 ng/ml) $p =$

0.27. Similarly, there was no significant difference ($P = 0.2625$) in testosterone of rats subjected to orchidopexy and aspiration Group 3 ($3.96 \pm 0.80\text{ng/ml}$) compared with animals subjected to isolated orchidopexy Group 4 ($4.99 \pm 1.96\text{ng/ml}$) $p = 0.26$. The surgical sperm retrieval did not cause hypogonadism in orquidopexics animals. Testosterone Group 2 (orchidopexy and extraction), and Group 1 animals were not operated ($5.35 \pm 4.65\text{ng/ml}$) and ($4.75 \pm 1.45\text{ng/ml}$), respectively, $p = 0.76$. There was no difference in testosterone of animals subjected to orchidopexy and extraction ($5.35 \pm 4.65 \text{ ng / ml}$) compared with animals underwent isolated orchidopexy ($4.99 \pm 1.96 \text{ ng / ml}$) $p = 0.86$. There was no significant difference comparing testosterone Sham Group Group 4 ($3.70 \pm 1.27\text{ng/ml}$), rats subjected to orchidopexy and simulated operation with non-operated animals ($4.75 \pm 1.45\text{ng/ml}$) $p = 0.21$. The absolute number of sperm obtained by extraction technique (41.00 ± 7.01) was significantly higher than the number of spermatozoa obtained by aspiration technique (21.33 ± 8.14) $p = 0.0012$. The weight of testicular tissue obtained by extraction technique ($0.09 \pm 0.02 \text{ g}$) was significantly higher than that obtained by aspiration technique ($0.04 \pm 0.04 \text{ g}$) $p = 0.0452$. Regarding the effect of collecting sperm in erectile function there was no significant difference comparing Groups 1 and 4 for the reason ICP/MAP (intracavernous pressure/mean arterial pressure) and for the AUC (area under the curve) in neither of the frequencies (Hz 2,4,6,8,10). There was no significant difference comparing Groups 2, 3 and 4 for the reason PIC/PAM and ASC for none of the frequencies (2,4,6,8,10Hz). In conclusion, the harvest of testicular sperm in orquidopexics rats by extraction technique or by aspiration did not change the gonadal and erectile function of the animal. The amount of sperm obtained in the extraction technique was greater than the aspiration technique.

Keywords: Fertility. Testosterone. Hypogonadism. Erectile function. Rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Anatomia do Testículo.....	17
1.2 Histologia do Testículo.....	18
1.3 Controle e Função do Testículo	19
1.4 Infertilidade Masculina	20
1.5 Testosterona e Função Erétil	22
1.5.1 Definição de Hipogonadismo	22
1.5.2 Disfunção Erétil	23
1.5.2.1 Fisiologia da Ereção Peniana	24
1.5.2.2 Anatomia Peniana	24
1.5.2.3 Anatomia Peniana do Rato	24
1.5.2.4 Neuroanatomia Peniana	25
1.5.2.4.1 Vias Periféricas	25
1.5.2.4.2 Vias Autonômicas	26
1.5.2.4.3 Vias Somáticas	26
1.5.2.5 Hemodinâmica da Ereção Peniana	27
1.5.2.5.1 Suprimento Arterial	27
1.5.2.5.2 Drenagem Venosa	27
1.5.2.5.3 Sistema Sinusoidal	28
1.5.2.6 Mecanismo da Ereção	28
1.5.3 O Rato como Modelo de Estudo da Ereção Peniana	29
1.5.4 Papel da Testosterona na Fisiologia da Ereção	31
1.5.5 Hipogonadismo como Causa de Disfunção Erétil	33
1.6 Justificativa e Relevância	34
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Principal	35
2.2 Objetivo Secundário	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Animais	36
3.2 Estudo Piloto para Promover Falha na Espermatogênese Orquidopexia Experimental.....	36
3.2.1 Orquiectomia.....	36

3.3 Protocolo Experimental	37
3.3.1 Grupos Experimentais	37
3.4 Técnicas para Captação de Espermatozoides	38
3.4.1 Extração Cirúrgica	38
3.4.2 Aspiração	39
3.4.3 Grupo Simulado (SHAM)	40
3.5 Monitoramento da Pressão Intracavernosa.....	40
3.6 Processamento do Tecido Testicular Extraído	42
3.7 Avaliação Hormonal	42
3.8 Coleta de Sangue	43
3.9 Análise Estatística	44
4 RESULTADOS	45
4.1 Orquidopexia Experimental (dano à Espermatogênese)	45
4.2 Efeito da Orquidopexia na Função Gonadal.....	46
4.3 Efeito da Aspiração de Espermatozóides na Função Gonadal.....	47
4.4 Efeito da Extração de Espermatozóides na Função Gonadal.....	48
4.5 Efeito da Operação Simulada na Função Gonadal.....	50
4.6 Avaliação da Captação de Espermatozoides	51
4.7 Efeitos da Captação de Espermatozoides na Função Erétil.....	52
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO A – DECLARAÇÃO DA CEPA.....	80

INTRODUÇÃO

A definição de infertilidade modificou o paradigma da avaliação individual para avaliação do casal. Dessa forma, não se fala mais em homens inférteis ou mulheres inférteis, mas sim em Infertilidade Conjugal (IC) (ARAÚJO AND BARROSO, 2008). O termo Infertilidade Conjugal é definido como a ausência de gravidez após um ano de relações sexuais bem distribuídos ao longo do ciclo menstrual, sem o uso de métodos anticonceptivos devidamente reconhecidos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

A prevalência da IC na população americana (Estados Unidos da América) é estimada em mais de 7 milhões de casais . Aproximadamente 15% dos casais não conseguem a gravidez após um ano de tentativa; no segundo ano 50% conseguem e no terceiro ano 14%. Em consequência menos de cinco por cento dos casais persistem inférteis. Nenhuma causa de infertilidade pode ser encontrada usando exames de rotina em 10-15% dos casais. O fator masculino como causa de infertilidade é a única etiologia em 30% dos casais e fator contribuinte em pelo menos 50% dos casos de IC (JUNGWIRTH *et al.*,2012).

1.1 Anatomia do Testículo

O testículo do rato deve estar completamente descido com 30 a 40 dias de vida, mas o canal inguinal mantém-se aberto e durante os períodos de inatividade sexual permanecem na cavidade abdominal. Cobrindo a parte anterior do testículo tem-se a cabeça do epidídimo e, continuando com uma massa mais contrita de túbulos, forma-se o corpo do epidídimo, que percorre a superfície do testículo até sua porção posterior, onde forma a cauda do epidídimo. O restante do corpo e toda a cauda do epidídimo estão ligados ao testículo apenas pela cabeça e parte do corpo do epidídimo, entremeados por um tecido adiposo abundante. Da cauda do epidídimo sai o ducto deferente que desemboca na próstata, juntamente com a vesícula seminal e a glândula coagulatória. Existem 2 pares de glândulas prostáticas, que praticamente abraçam a porção final do ducto deferente e estão ligados à fáscia que se estende sobre a bexiga urinária. O testículo é irrigado pela artéria testicular que nasce na aorta. A drenagem venosa se dá através do plexo

pampiniforme que termina como veia espermática interna, desembocando na veia cava à direita e na veia renal à esquerda (GREENE, 1963).

No homem, localiza-se dentro do escroto e é coberto em sua face ântero-lateral e medial por uma membrana chamada túnica vaginal, formando uma cavidade fechada originada da reflexão peritoneal durante a migração retroperitoneal do testículo. Em sua borda posterior, o testículo associa-se ao epidídimo e com o cordão espermático, com esse último incorporando o canal deferente e as estruturas neurovasculares, que se dirigem e terminam na porção média e superior da borda superior do testículo. Nervos e vasos entram e saem do testículo através de um tecido conjuntivo fibroso, espesso e aderido à túnica vaginal, chamado túnica albugínea, que no homem é opaca, mas em muitas espécies, como no rato, é transparente. O testículo é irrigado pela artéria testicular, que entra no testículo posteriormente, descendo através do seu pólo inferior, bem junto à túnica albugínea, sendo essa região conhecida como túnica vasculosa. No testículo humano os ramos principais da artéria ascendem junto à superfície anterior, antes de os ramos menores penetrarem o parênquima. A região lateral e medial do polo superior do testículo é onde é menos provável se lesar um ramo arterial maior durante uma incisão da túnica albugínea do testículo humano. Posteriormente a túnica albugínea se espessa, penetrando no parênquima testicular para formar um mediastino, que dá passagem e liga os túbulos seminíferos com os ductos eferentes e o epidídimo. Numerosos septos de tecido conjuntivo estendem-se para dentro da túnica albugínea através do mediastino, formando lobos piramidais incompletos que suportam os túbulos seminíferos, cuja parte terminal desemboca no mediastino na forma de extensões tubulares chamadas túbulos retos. No homem, os túbulos seminíferos são circunvolutos, já em roedores formam numerosos segmentos relativamente lineares (SIMÃO, 2000).

1.2 Histologia do Testículo

A célula de Leydig do testículo é a principal fonte de andrógenos no sexo masculino. O achado ultraestrutural mais proeminente dessas células são as abundantes quantidades de retículo endoplasmático liso e uma razoável quantidade de mitocôndrias. Gotículas de lípidos são comuns nas células de Leydig de várias espécies, mas não no rato adulto de laboratório. A biossíntese da testosterona é

catalizada por enzimas localizadas predominantemente em membranas do retículo endoplasmático liso e no citoplasma adjacente, embora alguns poucos estágios ocorra no interior das membranas mitocondriais (LIEBERMAN AND PRASAD, 1990).

MORI AND CHRISTENSEN (1980) realizaram uma análise morfométrica da célula de Leydig no testículo normal do rato e concluíram que no estado *a fresco* os testículos usados em seu estudo pesavam em média 1,6 gramas e tinham um volume médio de 1,54 centímetros cúbicos. No testículo inteiro, 82,43% do volume era ocupado pelos túbulos seminíferos, 15,64% pelo tecido intersticial e 1,93% pela túnica albugínea. Quando se retirava a túnica albugínea, 84% do volume testicular era representado pelos túbulos seminíferos e 16% pelo tecido intersticial, sendo que 2,8% do volume total era representado pelas células de Leydig.

JOHNSON, PETTY AND NEAVES (1980) estudaram comparativamente o testículo do homem e do rato. Esses autores constataram que a produção de espermatozóides por testículo é semelhante no homem e no rato apesar da diferença de 10 vezes na massa testicular. A análise histométrica do testículo perfundido com glutaraldeído revelou várias diferenças, como um maior número de túbulos seminíferos e epitélio seminífero por grama de tecido no rato. Observaram também uma proporção relativamente maior dos componentes intersticiais. O epitélio seminífero do rato continha 40% mais células germinativas.

1.3 Controle e Função do Testículo

Os principais fatores que controlam a produção de testosterona pela célula de Leydig e a produção de espermatozóides pelos túbulos seminíferos são os hormônios gonadotrópicos LH (Hormônio Luteotrófico) e FSH (Hormônio Folículo Estimulante), respectivamente. Esses dois hormônios são produzidos pela hipófise anterior sob o controle da produção episódica de Fator Liberador de Gonadotrofina Coriônica (GnRH). Além do GnRH, a secreção do LH e FSH é controlada pelo nível de testosterona e inibina produzida pelo testículo, através de *feedback* negativo. Portanto, embora o LH e o FSH sejam absolutamente necessários, não são suficientes para uma função normal da célula de Leydig. Além dessa regulação endócrina, a célula de Leydig sofre influência de mecanismos parácrinos e autócrinos. Embora seja útil considerar o testículo um órgão dividido em compartimentos com funções separadas, há evidências de que estas funções estão

intimamente relacionadas através de fatores conhecidos e desconhecidos. Além disso, evidências atuais indicam que a ação estimulatória dos túbulos seminíferos, do FSH e LH, este último através da testosterona, é modulada por fatores locais (CAROPPO, 2009).

O interstício testicular é o espaço que separa os túbulos seminíferos e que contém numerosos tipos celulares, como células de Leydig, macrófagos, células endoteliais vasculares e linfáticas. No rato foi sugerida uma interação funcional entre a célula de Leydig e o macrófago, devido a observação *in vivo* de múltiplos pontos de contato especializados entre essas duas células. Uma regulação local da esteroidogênese da célula de Leydig foi sugerida através da demonstração de que elementos isolados de cultura de macrófagos podiam regular a síntese de testosterona *in vitro*. Outras numerosas substâncias secretadas pelos macrófagos têm o poder de regular a síntese de testosterona pela célula de Leydig. Exemplos destas substâncias são o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-1), Fator de Crescimento de Fibroblasto, citocinas, oxitocina, angiotensina e endotelina (SAEZ, 1994).

1.4 Infertilidade Masculina

Infertilidade masculina é frequentemente definida como análise seminal anormal. Astenozoospermia e azoospermia são as anormalidades seminais mais comumente detectadas (AZIZ, 2013). Azoospermia, a qual está presente em 14% dos homens que se apresentam para avaliação, é classificada como obstrutiva ou não obstrutiva. Até 1992 as opções para homens portadores de azoospermia não obstrutiva era a adoção ou utilização de sêmen de doador. Posteriormente, com o desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida utilizando injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) houve uma revolução no tratamento dos homens inférteis. Após o sucesso desta técnica a biópsia testicular se tornou não apenas um procedimento diagnóstico para medir o grau de espermatogênese, mas também uma técnica terapêutica para captar espermatozóides para ser utilizado na ICSI. Em consequência dessa nova tecnologia, surgiu a necessidade de técnicas de captação de espermatozóides mais simples, menos invasivas, no entanto mais sofisticadas. A demanda por vias menos invasivas de captação de espermatozóides em pacientes com produção espermática abundante (ex., ausência

congenita de vasos deferentes, obstrução do trato reprodutivo) encorajou o desenvolvimento de abordagens cirúrgicas minimamente invasivas, tais como aspiração percutânea de espermatozoides epididimários e extração ou aspiração de espermatozoides testiculares. A habilidade da fertilização in vitro (FIV) ou ICSI em resolver até os mais complexos casos de infertilidade relacionados ao fator masculino, tais como azoospermia não obstrutiva, foi acompanhada pelo desenvolvimento de técnica mais sofisticada de captação espermática e extração microcirúrgica de espermatozoides testiculares naqueles pacientes com grave comprometimento da espermatogênese (KARPMAN AND WILLIAMS, 2009). Várias técnicas de captação de espermatozoides têm sido descritas para a coleta de esperma de homens com azoospermia não obstrutiva para utilização em FIV e ICSI (SMITH *et al.*, 2012). Todavia a espermatogênese é limitada em homens com azoospermia não obstrutiva. Falha na captação de espermatozoides do testículo pode ocorrer em até 57% das tentativas (SIGMAN AND JAROW, 2007). A razão para se tentar captar espermatozoides de testículos de homens com aparente ausência de espermatogênese foi baseada no estudo quantitativo e histológico de biópsias testiculares de homens férteis e inférteis (SILBER AND RODRIGUEZ-RIGAU, 1981). Alguns homens com azoospermia não obstrutiva tinham áreas focais de espermatogênese no testículo, apesar do fato de que a função espermatogênica global do testículo estava gravemente comprometida. Parece que uma quantidade mínima de espermatogênese é necessária para que o espermatozoide seja capaz de alcançar o ejaculado.

As abordagens para captação de espermatozoides incluem biópsia testicular aberta, percutânea, extração epididimária microcirúrgica e percutânea, e extração espermática testicular com e sem microscopia (LIPSHULTZ *et al.*, 2007). Biópsias testiculares múltiplas podem resultar em perda significativa de parênquima testicular, além de poder interromper o suprimento sanguíneo testicular que passa sob a túnica albugínea, com risco de completa desvascularização testicular e subsequente atrofia do testículo (SCHLEGEL AND SU, 1997). O desenvolvimento de extração espermática testicular microcirúrgica por Schlegel permitiu uma melhora nas taxas de captação espermática com menos dano testicular que a biópsia testicular aberta padrão. A assistência microcirúrgica promoveu uma melhora na visualização dos túbulos seminíferos dilatados que contêm focos ativos de espermatogênese. As taxas de captação em homens com

azoospermia obstrutiva chega a 63% comparado com 45% das taxas de técnicas padrão de biópsias múltiplas. O volume do tecido testicular removido é também significativamente menor (SCHLEGEL, 1999). Porém um dos problemas desta técnica é que ela requer uma longa curva de aprendizado (ISHIKAWA *et al.*, 2010), além de ter longo período operatório (RAMASAMY *et al.*, 2011).

Lesões vasculares podem ocorrer nas cirurgias testiculares. O suprimento sanguíneo arterial testicular é derivado primariamente de ramos da artéria espermática interna, com ramos colaterais da cremastérica e vasal (SCHLEGEL AND CHANG, 1991). Independente de sua origem, o suprimento arterial testicular penetra a túnica albugínea cobrindo o parênquima testicular e atravessa extensivamente sob a túnica albugínea, mas sobre a superfície dos túbulos seminíferos, antes de penetrar entre os septos que separam os túbulos seminíferos. As artérias sub-túnicas são artérias terminais. Ligação ou divisão destas artérias durante a biópsia testicular pode desvascularizar uma região do testículo. Um elegante estudo de autópsia humana estudou o suprimento sanguíneo testicular e mostrou que nenhuma área da túnica albugínea pode ser aberta sem um potencial risco de lesão de um vaso maior do testículo, incluindo o risco de completa desvascularização testicular (JAROW, 1991).

Alguns homens inférteis podem apresentar baixos níveis séricos de testosterona devido uma diminuição da função das células de Leydig. Após a remoção de grande quantidade de tecido testicular em uma biópsia existe uma inevitável perda das células de Leydig, que podem diminuir mais ainda os níveis de testosterona resultando em sérias consequências a longo prazo tais como osteoporose, aumento da resistência insulínica, depressão e disfunção erétil. Algumas destas biópsias podem, infelizmente, resultar em uma permanente diminuição nos níveis séricos de testosterona requerendo terapia de reposição de testosterona a longo prazo (RAMASAMY AND SCHLEGEL, 2011).

1.5 Testosterona e Função Erétil

1.5.1 Definição de Hipogonadismo

Não existe uma concordância universal na exata definição de hipogonadismo. Entretanto, é geralmente aceito que hipogonadismo se refere à

presença de testosterona circulante persistentemente baixa, quando comparado a níveis normais de jovens saudáveis e homens de meia idade. Essa variação é aproximadamente 300-1000ng/dL ou 10,4-34,7nmol/L na maioria dos ensaios de testosterona sérica total, embora larga variação possa existir entre diferentes ensaios comerciais. Baseado em dados de estudo prospectivo do Massachusetts Male Aging Study, MOHR *et al.*, (2005) recentemente propuseram um limite idade-específico abaixo do qual um homem é considerado como tendo testosterona total anormalmente baixa: 251, 216, 196, e 156ng/dL para homens com seus 40,50,60 e 70 anos, respectivamente. Frequentemente, hipogonadismo está associado a características clínicas inespecíficas tais como fadiga, fraqueza, diminuição da libido e energia, disfunção erétil, redução da massa muscular e óssea, e aumento da gordura abdominal (MIKHAIL, 2006).

CORPECHOT *et al.* (1997) desenvolveram um método de radioimunoensaio para dosagem de testosterona no plasma de ratos adultos do sexo masculino. O seguinte valor foi encontrado: (pg/ml \pm SD): 3,138 \pm 1,73. COLLINS (1973) relatou problemas do radioimunoensaio para a testosterona. Segundo este autor, o maior problema permanece sendo a 5alfa-diidrotestosterona, que é estruturalmente similar, e é um andrógeno biologicamente ativo, e apresenta reação cruzada em vários graus com o anti-soro usado para a testosterona. O método dá uma superestimação próxima de 10%.

1.5.2 Disfunção Erétil

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade de alcançar ou manter ereção peniana adequada para a satisfação sexual (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS STATEMENT, 1993). A disfunção erétil ocorre em graus variáveis e prejudica a qualidade de vida, particularmente o bem-estar pessoal e as inter-relações familiares e sociais (JOHANNES *et al.*, 2000). Estima-se que a prevalência mundial de disfunção erétil acometa mais de 152 milhões de homens, e as projeções para 2025 mostram uma prevalência de aproximadamente 322 milhões. No Brasil, alguns estudos com base populacional sobre esta disfunção sugerem que aproximadamente 40% a 46% dos brasileiros, com 40 a 70 anos de idade, apresentam algum grau de DE (MOREIRA e col., 2001, 2002). Com base nos dados destes estudos nacionais, estima-se que

atualmente cerca de 11,3 milhões de homens com mais de 18 anos têm disfunção moderada ou severa. A disfunção erétil está associada a fatores de risco como doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, envelhecimento, tabagismo e sedentarismo.

1.5.2.1 Fisiologia da Ereção Peniana

1.5.2.2 Anatomia Peniana

O pênis humano é composto de três segmentos cilíndricos: os corpos cavernosos pareados localizados na parte dorsal e o corpo esponjoso na parte ventral, o qual circunda a uretra e forma a glândula peniana na porção distal. Cada um dos corpos cavernosos é circundado por um tecido fibroso e compacto, a túnica albugínea, a qual é constituída em grande parte de fibras de colágeno, bem como de algumas fibras de elastina (SATTAR *et al.*, 1994). O tecido erétil dos corpos cavernosos é composto de múltiplos espaços lacunares interconectados, revestidos por células endoteliais, além das trabéculas, que formam as paredes dos espaços sinusoidais, e consistem de bandas espessas de músculo liso e de uma estrutura fibroelástica formada por fibroblastos, colágeno e elastina (GOLDSTEIN *et al.*, 1982; KRANE *et al.*, 1989). Os corpos cavernosos são divididos por um septo perfurado, incompleto no humano, que os permite funcionar como uma unidade.

A parte proximal do pênis encontra-se ancorada no osso pélvico, sendo esta região denominada crura dos corpos cavernosos, enquanto a parte proximal do corpo esponjoso forma o bulbo peniano. Tanto a crura quanto o bulbo estão conectados aos músculos estriados. O bulbo peniano está circundado pelo músculo bulbo cavernoso (ou bulbo esponjoso), ao passo que a crura peniana está circundada pelo músculo isquiocavernoso. A glândula peniana apresenta uma aparência de esponja devido a um vasto plexo venoso com um grande número de anastomoses.

1.5.2.3 Anatomia Peniana do Rato

Os pênis de todos os mamíferos são compostos por um par de elementos hidrostáticos: os corpos cavernosos e o corpo esponjoso. Mas alguns mamíferos

(especificamente alguns carnívoros, insetos, roedores, morcegos, e primatas) têm um elemento adicional em seus pênis. O baculum, ou os *penis*, é um osso encontrado no tecido glandar, na porção distal do pênis, dorsal à uretra, com sua porção proximal confinada à porção distal do corpo cavernoso. Sua função durante a cópula ainda não é bem conhecida. KELLY (2000) propôs que o baculum aumente a rigidez total do pênis durante a cópula através de forças compressivas da porção distal da glândula sobre a parede tensa do corpo cavernoso. Forças na porção distal do pênis durante a cópula pressionam o baculum contra o corpo cavernoso reduzindo seu volume interno e aumentando a pressão intracavernosa.

Uma outra característica especial da anatomia peniana do rato diz respeito aos músculos estriados penianos. Além dos músculos bulboesponjoso e ísquiocavernoso, existe no rato um par de músculos que saem da crura e bulbo peniano, que se unem na rafe mediana sobre a veia dorsal do pênis, que se chama músculo ísquiouretral. O papel dos músculos extrínsecos varia de acordo com as espécies. Nos ratos estes músculos participam ativamente dos eventos vasculares durante a ereção. Por exemplo, em adição à sua ação na emissão do sêmen, o músculo bulbouretral pode forçar o sangue do bulbo peniano para a glândula durante a ereção. O músculo ísquiocavernoso é responsável pela retificação da haste peniana e facilitação da penetração. Os autores WILLIAN AND BENJAMIN (1991) estudaram e identificaram a inervação do músculo ísquiouretral, e propuseram que estes músculos contribuíam para uma intensa ereção glandar por compressão da veia dorsal profunda.

1.5.2.4 Neuroanatomia Peniana

1.5.2.4.1 Vias Periféricas

A inervação do pênis é autonômica (vias simpáticas e parassimpáticas) e somática (vias sensoriais e motoras). A partir da coluna espinhal e dos gânglios periféricos, as inervações simpáticas e parassimpáticas confluem, formando o nervo cavernoso, que adentra os corpos cavernosos e esponjosos para efetuar os eventos neurovasculares durante a ereção e detumescência. Os nervos somáticos são responsáveis pelas sensações e pela contração dos músculos bulbo cavernoso e ísquiocavernoso (DEAN AND LUE, 2005).

1.5.2.4.2 Vias Autonômicas

A via simpática origina-se do 11º segmento torácico e do 2º lombar, passando através do ramo ventral do nervo espinhal (ramo comunicante branco) para a cadeia ganglionar simpática. Algumas fibras dirigem-se através dos nervos esplânicos para os plexos hipogástrico superior e mesentérico inferior, através do nervo hipogástrico, em direção ao plexo pélvico (DE GROAT AND BOOTH, 1993; DEAN AND LUE, 2005).

A via parassimpática surge de neurônios localizados do 2º ao 4º segmentos sacrais. As fibras pré-ganglionares passam pelo plexo hipogástrico superior pélvico para o plexo pélvico. Os nervos cavernosos então se ramificam do plexo pélvico em direção ao pênis (WALSH et al., 1990). A estimulação do plexo pélvico e do nervo cavernoso induz ereção, enquanto que a estimulação do tronco simpático causa detumescência.

1.5.2.4.3 Vias Somáticas

A via somatosensorial origina-se de receptores sensoriais localizados na pele do pênis, da glândula, da uretra e no interior do corpo cavernoso. Na glândula do pênis humano há inúmeras terminações aferentes (terminações nervosas livres e receptores corpusculares (HALATA AND MUNGE, 1986; DEAN AND LUE, 2005). As fibras nervosas que partem dos receptores convergem para o nervo dorsal do pênis que se unem a outros nervos formando o nervo pudendo. Este último adentra a coluna espinhal via segmentos S2 a S4 para terminais nos neurônios espinhais e interneurônios na região cinzenta central do segmento lombo sacral (MCKENNA, 1998; DEAN AND LUE, 2005). A ativação destes nervos sensoriais envia mensagens de dor, temperatura e toque pelas vias espinotalâmicas e espinoreticular para o tálamo e córtex sensorial desencadeando a percepção sensorial (BURNETT et al., 1993; DEAN AND LUE, 2005). O núcleo de Onuf, do 2º ao 4º segmento sacral, é o centro da inervação somatomotora peniana. Estes nervos dirigem-se através dos nervos sacrais para o nervo pudendo para inervar os músculos ísquios e bulbo cavernosos. A contração do músculo isquiocavernoso participa da fase rígida da ereção, ao passo que a contração rítmica do músculo bulbo cavernosa é necessária para a ejaculação (DEAN AND LUE, 2005).

1.5.2.5 Hemodinâmica da Ereção Peniana

1.5.2.5.1 Suprimento Arterial

O suprimento de sangue para o pênis deriva-se principalmente da artéria pudenda interna. Na maioria dos homens, esta artéria origina-se de uma das divisões do tronco isqueopudendo da artéria ilíaca interna ao nível da junção sacro-ilíaca. Após atravessar o tronco perineal no Canal de Alcock, a artéria pudenda interna origina a artéria peniana, a qual se subdivide na porção terminal em quatro ramos, designado artérias dorsal, uretral (esponjosa), cavernosa e bulbar. A artéria dorsal adentra o pênis, sendo responsável pela rigidez da glândula peniana durante a ereção. A artéria esponjosa (ou uretral) corre longitudinalmente através do corpo esponjoso lateral até a uretra. Durante seu curso, ela abastece o corpo esponjoso, tecido uretral e glândula peniana. A artéria cavernosa do pênis corresponde a um vaso bastante estreito que adentra o pênis juntamente com as veias e os nervos cavernosos. Após adentrar os corpos cavernosos, a artéria cavernosa divide-se em múltiplas ramificações terminais conhecidas como artérias helicinais, assim conhecidas devido ao seu aspecto espiralado durante o estado flácido. Estas artérias abastecem os espaços sinusoidais. A artéria bulbar adentra o bulbo do pênis logo após sua origem, e fornece sangue à glândula e ao bulbo uretral proximal.

1.5.2.5.2 Drenagem Venosa

O pênis é drenado por três subdivisões de veias: superficiais, intermediárias e profundas. A drenagem venosa dos corpos cavernosos ocorre através das vênulas, localizadas entre a periferia do tecido erétil e a túnica albugínea. As vênulas se fundem para formar as veias emissárias maiores as quais rompem a túnica albugínea, e drenam em veias penianas extra-túnicas denominadas veias cavernosa e crural (PUECH-LEAO *et al.*, 1987; KRANE *et al.*, 1989). O conjunto de veias intermediárias emerge da glândula peniana e forma o plexo retro coronal que drena na veia dorsal. Uma série de veias emissárias e circunflexas dos corpos cavernosos drena na veia dorsal profunda, a qual corre no sentido proximal na linha média entre os dois corpos cavernosos para esvaziar o plexo periprostático.

O sistema venoso profundo drena tanto os corpos cavernosos quanto o corpo esponjoso. Os espaços cavernosos são drenados através de um conjunto de veias emissárias que rompem a túnica albugínea. Nas posições médias e distais, tais veias se fundem para formar as veias circunflexas, as quais se esvaziam na veia dorsal profunda. Na região proximal do pênis, as veias emissárias formam a veia cavernosa (veia profunda do corpo cavernoso), que atinge a veia pudenda interna. O corpo esponjoso drena através de um conjunto de veias uretrais e bulbares.

1.5.2.5.3 Sistema Sinusoidal

Os sinusóides são espaços formados irregularmente por trabéculas e consistem de bandas de músculo liso, fibras elásticas, colágeno e um tecido frouxo contendo numerosas arteríolas e nervos. Estes sinusóides contêm sangue e são consideradas unidades contráteis intrinsecamente ativas sensíveis aos estímulos neurológicos; dessa maneira, possuem papel fundamental nos mecanismos de ereção e detumescência.

1.5.2.6 Mecanismo da Ereção

Normalmente, vários estímulos sexuais resultam na liberação do vasodilatador óxido nítrico (NO) das fibras nervosas não adrenérgicas e não colinérgicas no tecido cavernoso peniano, e das células endoteliais das arteríolas penianas. O NO ativa a enzima guanil-ciclase, resultando na geração do segundo mensageiro, guanosina cíclica monofosfato (cGMP). O cGMP diminui a captação de cálcio para dentro da musculatura lisa vascular e cavernosa, levando à dilatação dos sinusóides cavernosos e ereção peniana. A expansão dos sinusóides cheios de sangue contra a túnica albugínea comprimem as veias que carregam o sangue para fora do pênis. A diminuição do fluxo venoso para fora do pênis ajuda a manter a ereção. Subsequentemente, a degradação do cGMP pela fosfodiesterase (PDE5) leva perda da dilatação arteriolar e detumescência peniana (COHAN *et al.*, 2001).

1.5.3 O Rato como Modelo de Estudo da Ereção Peniana

Os animais têm consistentemente assumido um maior lugar no desenvolvimento científico da fisiologia da ereção, e de fato o uso de modelos animais inaugurou este campo como verdadeira disciplina científica. O começo dos estudos científicos neste campo está associado com o estudo pioneiro experimental de ECKHARD (1863) que mostrou a importância dos nervos pélvicos para a função erétil através da estimulação elétrica destes nervos em cães anestesiados.

O entendimento que a ereção peniana depende do controle neurofisiológico foi confirmado e refinado através do trabalho de vários pesquisadores nesta área, que aplicaram modelos animais para mostrar a localização anatômica macroscópica e a relevância fisiológica dos nervos que saem da medula espinhal para a regulação da ereção peniana: o antagonismo da inervação parassimpática e simpática autonômica, e os nervos somáticos (DE GROAT AND BOOTH, 1993). Os impressionantes métodos de experimentação eletrofisiológica na pelve de mamíferos, utilizados por estes pesquisadores, continuam a ser aplicados em estudos de pesquisa moderna.

O conhecimento da ereção peniana é resultado de pesquisas em humanos e animais. Os primeiros animais utilizados nesses estudos foram o cão, o gato, e o macaco, por conta da facilidade técnica devido seu maior tamanho. Os custos com a compra e manutenção desses animais de maior porte eram consideráveis e poderiam ter entravado a pesquisa neste campo. A pouca disponibilidade desses animais para pesquisa médica também tem sido um problema. Isto levou a pesquisa de modelos animais mais baratos, e mais disponíveis, para o estudo da função erétil. Uma vez que o modelo de investigação da ereção no rato foi provado ser válido (STEERS, MALLORY AND DE GROAT, 1988), tem aumentado seu uso no desenvolvimento de novas direções de experimentação neurofisiológicas e neurofarmacológicas.

Embora a anatomia precisa possa diferir de espécie para espécie, o desenho geral da inervação autonômica pélvica dos mamíferos é marcadamente similar. As dissecções anatômicas demonstram um gânglio bilateral, lateral à próstata, chamado gânglio pélvico maior. Esses gânglios recebem ramos dos nervos pélvicos e hipogástricos e inervam as vísceras pélvicas. Um ramo mais largo emerge do gânglio pélvico maior e cursa ao longo da uretra para inervar os corpos

cavernosos, o nervo cavernoso. Estimulações elétricas deste nervo, ou do gânglio pélvico, levam a tumescência dos corpos cavernosos. Seguindo a ablação destes nervos, a estimulação elétrica falha em produzir ereção (QUINLAN *et al.*, 1989).

Este modelo de ereção no rato mostrou várias vantagens em relação aos outros já existentes: 1) o nervo cavernoso é facilmente identificado, 2) estimulação elétrica é facilmente realizada e reproduzível, 3) estudos comportamentais e neurofisiológicos são possíveis, e 4) os custos com compra e manutenção são baixos.

Estudos científicos em animais têm evidenciado a importância dos hormônios masculinos circulantes no suporte básico da ereção. A perda de andrógenos que ocorre após castração leva a perda da ereção, e a reposição de andrógenos promove a recuperação da função erétil (MEISEL, O'HANLOR AND SACHS, 1984). O modelo de indução de ereção no rato foi importante no estudo dos efeitos da castração na hemodinâmica da ereção peniana. Estudos de MILLS, STOPPER AND WIEDMEIER (1994) demonstraram que a ereção peniana no rato é andrógeno dependente, e que sete dias após a castração havia um significativo declínio na magnitude da resposta da pressão intracavernosa induzida pela estimulação do nervo cavernoso.

Estudos comparativos, quando possível, oferecem a melhor oportunidade de descrever similaridades e distinções em respostas funcionais entre outras espécies e humanos. Por outro lado, estudos independentes em certos modelos animais podem permitir inferências em relação aos humanos se demonstrar similaridades funcionais e morfológicas. Por exemplo, devido a anatomia vascular peniana e pélvica do rato ter sido cuidadosamente descrita, e mostrar semelhanças à humana, achados de ereção peniana relacionados a observações anatômicas em ratos podem ser relacionados com situações em humanos. Portanto, extrapolações de estudos animais continuarão a ser feitas inevitavelmente. Limitações de estudo direto da função sexual em seres humanos, tais como a inacessibilidade a espécimes teciduais, particularmente tecido peniano normal, e a impossibilidade de submeter humanos a rigorosos paradigmas experimentais, indicam que animais se manterão sujeitos a muitas pesquisas futuras no campo da fisiologia da ereção (AL BURNETT, 2001).

1.5.4 Papel da Testosterona na Fisiologia da Ereção

Hipogonadismo é um achado frequente na população de homens com disfunção erétil. Os androgênios influenciam o crescimento e desenvolvimento do trato reprodutor masculino e as características sexuais secundárias; seus efeitos na libido e comportamento sexual estão bem estabelecidos. Em uma revisão de pesquisas publicadas no período de 1975 a 1992, MULLIGAN AND SCHMITT (1993) concluíram que a testosterona aumenta o interesse e frequência sexual, além de aumentar a frequência de ereções noturnas. Mais recentemente, TRAISH *et al.* (2009) sugeriram que a deficiência de andrógenos está associado a resistência insulínica, diabetes tipo II, síndrome metabólica, e deposição de gordura visceral. A gordura visceral serve como um órgão endócrino, produzindo citocinas inflamatórias e promovendo disfunção endotelial e doença vascular, os quais são fatores importantes na gênese da disfunção erétil.

Os mecanismos dos efeitos androgênicos têm sido examinados por vários investigadores. Os andrógenos têm efeito benéfico nas células endoteliais e células musculares lisas: promovem a sobrevivência das células endoteliais, reduzem a expressão endotelial de marcadores pró-inflamatórios, e inibem a proliferação e migração intimal de células da musculatura lisa vascular. Baixos níveis androgênicos estão associados com apoptose de células endoteliais e células musculares lisas. Além disso, baixo nível androgênico impede proliferação e migração de células endoteliais progenitoras, além de diferenciação miogênica de células progenitoras mesenquimais (MIRONE *et al.*, 2009). Testosterona e dihidrotestosterona podem também relaxar a artéria peniana e musculatura lisa cavernosa através de seus efeitos não genômicos (WALDKIRCH *et al.*, 2008). Existem relatos de que a castração de ratos leva a diminuição do fluxo arterial, compromete mecanismo venoclusivo, e reduz a resposta erétil ao estímulo do nervo cavernoso em 50% (MILLS *et al.*, 1994). A castração leva a uma rápida redução da atividade da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (LUGG *et al.*, 1996). Isto é quase completamente revertido pelo NO, sugerindo que a geração de NO é o principal efeito de andrógenos. A castração também aumenta a resposta alfa-adrenérgica da musculatura lisa peniana (TRAISH *et al.*, 1999). REILLY *et al.* (1997) mostraram que a resposta a fenilefrina, um agonista alfa-1-adrenérgico, foi seis vezes maior em ratos castrados que em ratos com níveis de testosterona normal. Portanto, a testosterona

pode indiretamente melhorar a ereção por uma atenuação da atividade vasoconstrictiva alfa-adrenérgica na musculatura lisa dos corpos cavernosos. Em modelos experimentais *in vivo*, os inibidores da 5 alfa-redutase (enzima responsável pela conversão de testosterona em diidrotestosterona), muito utilizado de forma crônica para tratamento da hipertrofia prostática benigna e alopecia, têm sido associadas a redução da função erétil, com importantes alterações estruturais e funcionais no tecido peniano, contribuindo para fibrose peniana, que é motivado pela modulação da sensibilidade colinérgica e adrenérgica (PINSKY *et al.*, 2011). Em adição à sua ação periférica no pênis, a testosterona pode afetar a ereção através de mecanismos centrais (HEATON AND VARRIN, 1994). Estudos animais em ratos sugerem que a testosterona pode facilitar a ereção a nível da área mesolímbica dopaminérgica (MITCHELL AND STEWART, 1988).

A maioria dos estudos animais são de curto período observacional seguindo a castração e administração de andrógenos, que podem influenciar a remodelação nervosa e tecidual. Por outro lado, estudos em humanos são seccionais e mostram resultados divergentes. Alguns mostram uma significativa associação de andrógenos com várias medidas de função erétil (CORONA *et al.*, 2009; KWAN *et al.*, 1983) e outros não (RHODEN *et al.*, 2002). A maioria dos estudos clínicos são retrospectivos, não controlados para comorbidades, índice de massa corporal, e SHBG, e usaram métodos pouco confiáveis para os ensaios hormonais. Recente estudo prospectivo, utilizando espectrometria de massa, deu uma luz a esta questão controversa que é verificar a associação entre andrógenos e função erétil (O'CONNOR *et al.*, 2011). Este estudo encontrou que a Testosterona total está significativamente associada com a função sexual global, e a Testosterona livre com a disfunção erétil e frequência de masturbação, independente do 17- β -estradiol e diidrotestosterona. Mais importante este estudo identificou um valor limite de testosterona total de 8nmol/l acima do qual qualquer aumento na testosterona circulante perde a correlação positiva.

Estudos em humanos desenhados para examinar o possível efeito vasodilatador direto da testosterona na circulação arterial peniana são escassos, mas algumas evidências indiretas sugerem esta possibilidade. AVERSA *et al.* (2000) demonstraram uma correlação direta entre os níveis de testosterona livre e vasodilatação cavernosa avaliada pela ultrasonografia com Doppler em 52 homens eugonádicos com disfunção erétil. Em um ensaio randomizado, controlado com

placebo, de 10 homens com disfunção erétil arteriogênica e níveis plasmáticos de testosterona baixo-normal, os mesmos investigadores relataram que a suplementação de testosterona por 1 mês foi associado com aumento do fluxo sanguíneo para as artérias cavernosas (AVERSA *et al.*, 2003).

Os efeitos da testosterona na função sexual a nível do sistema nervoso central foram pouco estudados em humanos. Estudos preliminares em homens jovens saudáveis usando tomografia com emissão de pósitrons (PET) sugeriram que as zonas paralímbicas podem ser ativadas durante excitação visual sexual (STORELU *et al.*, 1999). Além disto, a ativação de alguma destas áreas se correlacionou com o aumento dos níveis plasmáticos de testosterona durante a excitação sexual. Portanto, novos estudos serão necessários para esclarecer os efeitos da testosterona na função erétil na vascularização peniana e sistema nervoso central.

1.5.5 Hipogonadismo como Causa de Disfunção Erétil

A mais forte evidência de um possível papel da testosterona na ereção vem de estudos em homens castrados. Na primeira série de casos publicado, 12 homens adultos castrados, a função erétil estava diminuída em todos os pacientes, com completa perda da ereção em seis deles (MCCULLAGH AND RENSHAW, 1934). Em estudos subsequentes de homens submetidos a orquiectomia bilateral ou estrogonioterapia para o tratamento de câncer de próstata, 22 de 38 (58%) dos homens que tinham ereção normal antes da castração relataram disfunção erétil após a castração (ELLIS AND GRAYHACK, 1963). O restante dos homens (42%) relataram que mantiveram a ereção através de aplicação de instrumento subjetivo. A persistência de aparente adequada ereção em alguns homens castrados sugere que uma acentuada redução na concentração sérica de testosterona ainda pode ser suficiente para manter a ereção. Em uma pequena série de seis homens com hipogonadismo severo, testosterona sérica total abaixo de 170ng/dL, a resposta erétil ao estímulo sexual visual foi similar a homens normais (KWAN *et al.*, 1983). Baseado nestes achados, muitos autores têm sugerido a possibilidade de existência de um nível limítrofe de testosterona sérica acima da qual a função erétil encontra-se intacta (NASSER MIKHAIL, 2006).

1.6 Justificativa e Relevância

Métodos cirúrgicos de se obter espermatozoides testiculares para fertilização têm evoluído em vários centros. As principais abordagens são a biópsia aberta por extração espermática testicular (TESE)(SILBER *et al.*,1995) e as aspirações percutâneas fechadas com agulhas finas (TESA) (CRAFT *et al.*, 1997). As biópsias abertas podem levar a potenciais efeitos adversos secundários à provável natureza traumática do procedimento. As biópsias aspirativas, por outro lado, são aparentemente menos traumáticas que a TESE (LEWIN *et al.*, 1999). Uma agulha com calibre 21 gauge, ou mais fina, é usada para aspirar o tecido sem abrir, ou teoricamente, sem traumatizar o testículo. A natureza menos traumática da punção aspirativa, juntamente com seu caráter ambulatorial, a torna um método ideal de captação de espermatozoides testiculares. Porém, outros autores (SHUFARO *et al.*, 2002), em estudo animal, encontraram que a punção aspirativa levou a um maior dano à arquitetura dos túbulos seminíferos, e a uma maior atrofia tubular, quando comparado à técnica de extração.

Estudos têm focado no potencial de captação de espermatozoides do testículo usando as técnicas já descritas, apesar dos achados histológicos de parada de maturação, hipoespermatogênese ou síndrome das células de Sertoli na biópsia testicular, que são características das azoospermias não obstrutivas. Entretanto, pouco se sabe sobre as consequências fisiológicas da extração de espermatozoides do testículo,na função gonadal e erétil.

Este estudo tem por objetivo avaliar o impacto nas funções hormonais e função erétil de ratos com falha na espermatogênese, além de verificar as taxas de captação de espermatozoides comparando a técnica de extração convencional com a aspirativa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Analisar o impacto da captação de espermatozoides na função gonadal e erétil no testículo de ratos com falha na espermatogênese, comparando as técnicas convencional e aspirativa.

2.2 Objetivo Secundário

1. Avaliação das taxas de captação de espermatozoides de testículos de ratos com falha na espermatogênese, comparando a técnica cirúrgica e aspirativa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram selecionados ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, machos, adultos (em torno de 200 dias de vida) e com peso entre 320-370 gramas. Os animais foram mantidos no laboratório de cirurgia experimental da Universidade Federal do Ceará, alojados em gaiolas de dimensões 40 x 32 x 17cm, em ciclos de claro/escuro (12/12h), e com acesso livre a água e alimentos. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, credenciado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea) / UNIFAC (protocolo número 77/2012).

3.2 Estudo Piloto para Promover Falha na Espermatogênese: Orquidopexia Experimental

Quatro ratos foram submetidos a anestesia (ketamina 80 mg/Kg e xilasina 6mg/Kg) no momento da cirurgia. Todos os instrumentos cirúrgicos foram submetidos a desinfecção. Após posicionamento em decúbito dorsal foi realizada incisão mediana em abdome inferior. Os testículos foram mobilizados para a cavidade abdominal. Foi realizada gubernaculectomia bilateral e os gubernáculos foram ancorados na parede abdominal anterior com fio nylon 4.0. Em seguida a incisão foi fechada em 2 planos, sutura contínua, com fio nylon 4.0. Os testículos foram extraídos e avaliados em intervalos diferentes (2 após 7 dias de orquidopexia, e os outros dois 14 dias após orquidopexia). O tecido extraído foi colocado em solução de Bouin e submetido a análise histológica para mostrar a eficácia da técnica de orquidopexia induzida cirurgicamente.

3.2.1 Orquiectomia

Dois ratos utilizados para análise da histologia testicular normal foram submetidos a orquiectomia da seguinte forma: após anestesia, já descrita acima, e apresentação bidigital do escroto, procedeu-se a incisão longitudinal mediana da bolsa escrotal com dissecação e isolamento bilateral do funículo espermático com

identificação dos testículos. Estes foram retirados, colocados em solução de Bouin e submetidos a análise histológica. Em seguida estes animais foram sacrificados por meio de translocação cervical.

3.3 Protocolo Experimental

3.3.1 Grupos Experimentais

Um total de 26 ratos foram randomizados da seguinte forma:

GRUPO 1 - Seis ratos controles (não operados) foram submetidos a dosagem de testosterona(D0) e no dia seguinte a monitorização da pressão intra-cavernosa(D1).

GRUPO 2 - Sete ratos foram submetidos a orquidopexia experimental (D0). Quinze dias (D15) depois foi dosado a testosterona e no dia seguinte (D16) submetidos à extração de espermatozóides testiculares. Uma semana depois (D23) foi feita nova dosagem de testosterona. No dia seguinte (D24) feito experimento para monitorização da pressão intra-cavernosa.

GRUPO 3 -Sete ratos foram submetidos a orquidopexia experimental (D0). Quinze dias (D15) depois foi dosado a testosterona e no dia seguinte (D16) submetidos à aspiração de espermatozóides testiculares. Uma semana depois (D23) foi feito nova dosagem de testosterona. No dia seguinte (D24) feito experimento para monitorização da pressão intra-cavernosa.

GRUPO 4 -Em Seis ratos foi dosado a testosterona (D0). No dia seguinte (D1) todos os animais foram submetidos à orquidopexia experimental. Quinze dias (D15) depois foi dosado a testosterona e no dia seguinte (D16) submetidos à procedimento simulado (sham). Uma semana depois (D23) foi feito nova dosagem de testosterona. No dia seguinte (D24) feito experimento para monitorização da pressão intra-cavernosa.

Tabela 1. Desenho do Estudo

26 ratos	D0	D1	D15	D16	D23	D24
Grupo 1 (6 ratos)	Testost	PIC				
Grupo 2 (7 ratos)	Orquidopex		Testost	TESE	Testost	PIC
Grupo 3 (7 ratos)	Orquidopex		Testost	TESA	Testost	PIC
Grupo 4 (6 ratos)	Testost	Orquidopex	Testost	SHAM	Testost	PIC

3.4 Técnicas para Captação de Espermatozóides

3.4.1 Extração Cirúrgica

Após os ratos serem anestesiados (ketamina 80mg/Kg e xilasina 6mg/Kg), via intraperitoneal, e colocados em decúbito dorsal, incisão mediana baixa foi realizada para exposição dos testículos previamente fixados na cavidade abdominal (como descrito no grupo piloto). Após identificação dos mesmos foram realizadas 3 incisões, em cada testículo (Figura 1), de aproximadamente 3 mm (polos superior, médio e inferior), com auxílio de bisturi lâmina 11. Leve compressão do testículo foi feita para promover extrusão do tecido testicular, com auxílio de tesoura o tecido foi coletado e encaminhado para análise imediata. Hemostasia foi realizada com simples compressão com gases. A túnica albugínea era deixada aberta. A cavidade abdominal foi fechada com sutura contínua com fio nylon 4.0.

Figura 1 – Extração cirúrgica de espermatozoides.



Fonte: próprio autor

3.4.2 Aspiração

Após os ratos serem anestesiados (ketamina 80mg/Kg e xilasina 6mg/Kg), via intraperitoneal, e colocados em decúbito dorsal, incisão mediana baixa foi realizada para exposição dos testículos previamente fixados na cavidade abdominal. Após identificação dos mesmos uma única punção com agulha 19 gauge foi realizada no polo inferior de ambos os testículos (Figura 2). Após a penetração da agulha no tecido uma pressão de sucção, para criação de pressão negativa, foi mantida com uma seringa de 20 ml. A agulha foi empurrada em diferentes sentidos de 4-6 vezes, de forma a atingir a maior área possível. O tecido aspirado foi então encaminhado para análise imediata. A túnica albugínea, no local da punção, era deixada aberta. A cavidade abdominal foi fechada com sutura contínua com fio nylon 4.0.

Figura 2 – Aspiração de espermatozoides.



Fonte: próprio autor

3.4.3 Grupo Simulado (SHAM)

Após os ratos serem anestesiados (ketamina 80mg/Kg e xilasina 6mg/Kg), via intraperitoneal, e colocados em decúbito dorsal, incisão mediana baixa foi realizada para exposição dos testículos previamente fixados na cavidade abdominal. Após identificação dos mesmos a cavidade abdominal foi fechada com sutura contínua com fio nylon 4.0.

3.5 Monitoramento da Pressão Intracavernosa

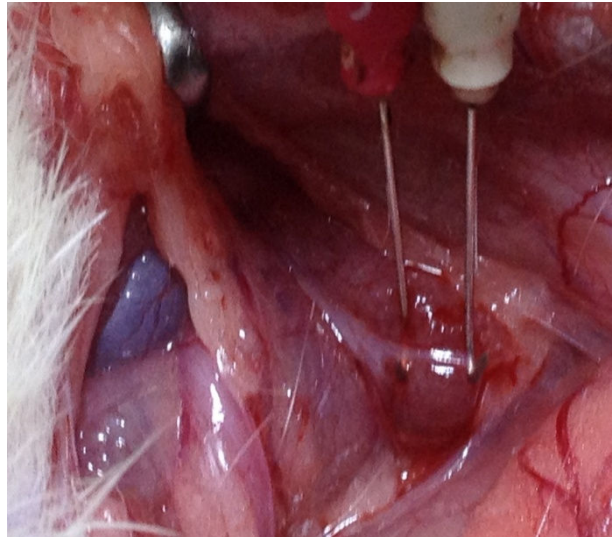
Os animais foram anestesiados com ketamina (80mg/Kg) e xilasina (6mg/Kg), por via intraperitoneal. A artéria femoral direita foi canulada para monitoramento contínuo da pressão arterial média (MAP). Uma cânula provida de agulha 26G foi inserida no corpo cavernoso direito para registro da pressão intracavernosa (ICP), usando-se transdutores de pressão (Grass, Astro-MedIndustrial Park, EUA). A cavidade abdominal foi aberta expondo o nervo cavernoso direito, localizado na região dorso-lateral da próstata (Figura 3). Um eletrodo bipolar de platina conectado a um estimulador (Grass S48, Quincy, MA, EUA) foi posicionado sobre o nervo cavernoso. Estimulações elétricas do nervo cavernoso (pulso de 1ms, 45s, 6V) a diferentes frequências (2,4,6,8 e 10Hz) foram aplicadas. Aguardava-se um intervalo de 4 minutos entre os estímulos. As alterações de tensão foram registradas em sistema PowerLab™ de aquisição de dados (software versão LabChart 8, AD Instruments, Australia) (Figura 4).

Para se avaliar a atividade erétil in vivo, adotamos dois parâmetros bastante utilizados na literatura, a razão ICP/MAP (pressão intracavernosa/pressão arterial média) e área sob a curva (AUC). A razão ICP/MAP é utilizada para se avaliar a atividade erétil quando a pressão arterial está alterada. O cálculo é realizado dividindo o pico máximo da ICP (independente da frequência utilizada) pela MAP.

A AUC é utilizada quando não se observa alterações de tensão, mas sim de tempo de resposta ao estímulo elétrico. O cálculo é feito a partir do início da estimulação elétrica (duração do estímulo 45s) até o retorno da resposta aos valores basais de pressão intracavernosa.

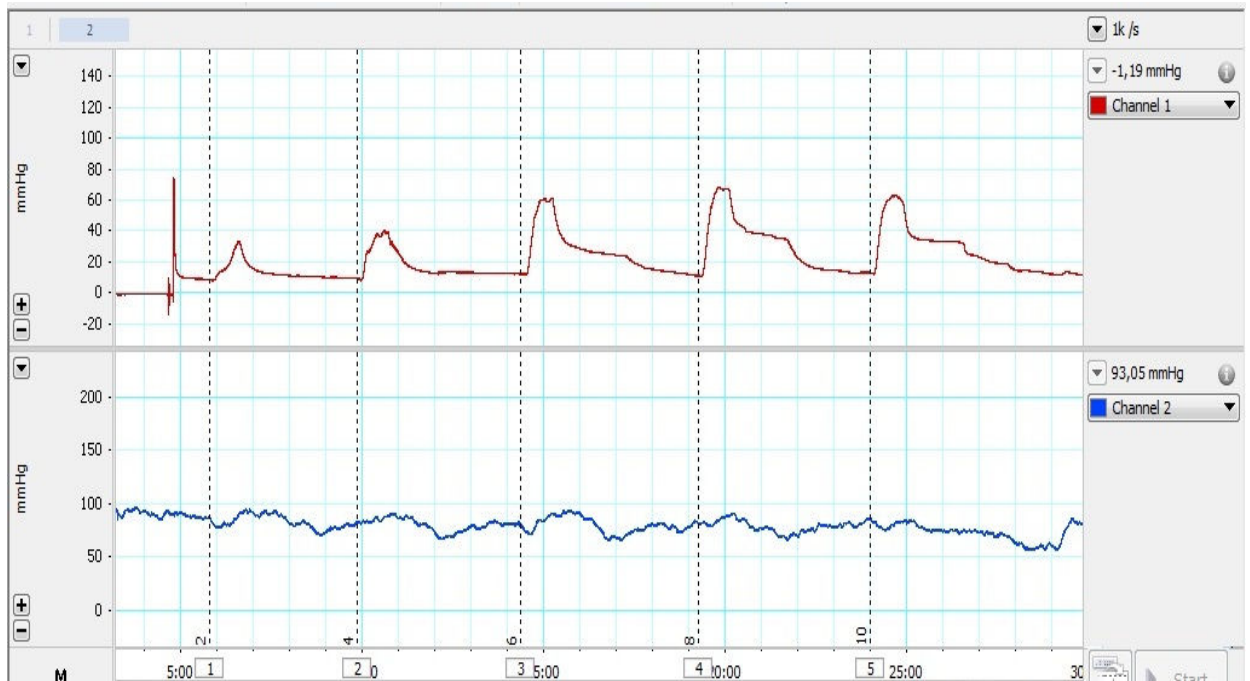
Ao final deste procedimento estes animais foram sacrificados por meio de translocação cervical.

Figura 3 – Nervo cavernoso.



Fonte: próprio autor

Figura 4 - Alterações de tensão (sistema PowerLab™).



Fonte: próprio autor

3.6 Processamento do Tecido Testicular Extraído

Os espermatozoides foram coletados por aspiração e extração dos testículos orquidopéxicos. Posteriormente, as amostras coletadas foram diluídas em 0,5 mL em solução salina a 0,9% e mantidas a 37°C para a realização da análise. Para a contagem dos espermatozoides 10µL da amostra foram colocados na câmara de Makler (Fig. 5) e a leitura foi realizada em microscopia com aumento de 100X. Foi realizada a contagem de duas amostras distintas de cada animal e para análise estatística foi calculada a média e desvio padrão.

Figura 5 - Câmara de Makler.



3.7 Avaliação Hormonal

A dosagem da testosterona foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do

Ceará. A dosagem da testosterona total plasmática foi executada por quimioluminescência (VIEIRA e col., 2008). O aparelho utilizado foi o BeckmanCoulter (Access 2 Immunoassay System). Antes das análises o aparelho foi devidamente calibrado com o Kit apropriado, e 6 dosagens piloto foram realizadas para se obter um valor basal. Todas as amostras foram dosadas em duplicata e o resultado foi expresso por nanograma por mililitro (ng/ml).

3.8 Coleta de Sangue

Após atingirem o plano anestésico a coleta foi feita por punção do seio venoso retro orbital (DIEHL et al., 2001), com cânula capilar, e obtida por meio de gotejamento de 1,5 mililitros de sangue para o interior de tubo coletor apropriado contendo anticoagulante (Figuras 6). O sangue foi submetido a centrifugação e o soro obtido foi congelado e assim mantido até o momento da dosagem da testosterona. A coleta se deu sempre no período compreendido entre 8 e 10 horas da manhã.

Figura 6 – Seio retro-orbital.



Fonte: Karl-Heinz Diehl, 2001

3.9 Análise Estatística

As variáveis quantitativas, contínuas e discretas, foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Assim, para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão, bem como foram empregados métodos paramétricos para a estatística analítica. Comparações entre dois grupos distintos foram realizadas por meio do teste t para dados não emparelhados. Para comparar dois diferentes momentos dentro do mesmo grupo, utilizou-se o teste t para dados emparelhados. Comparações entre três ou mais grupos foram feitas pela análise de variância para um fator de classificação (one-way ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. (ARMITAGE; BERRY, 1994).

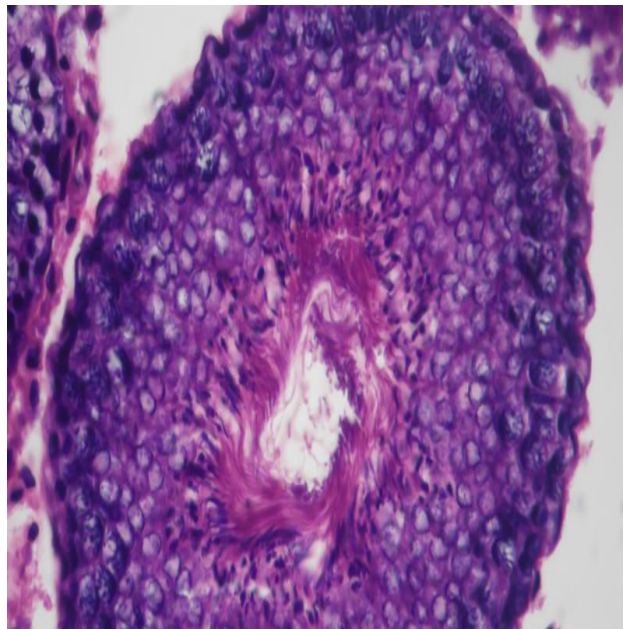
Em todas as análises, estabeleceu-se o nível de significância em 0,05 (5%). O software GraphPadPrism[®] versão 5.00 para Windows[®] (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 Orquidopexia Experimental (dano à Espermatogênese)

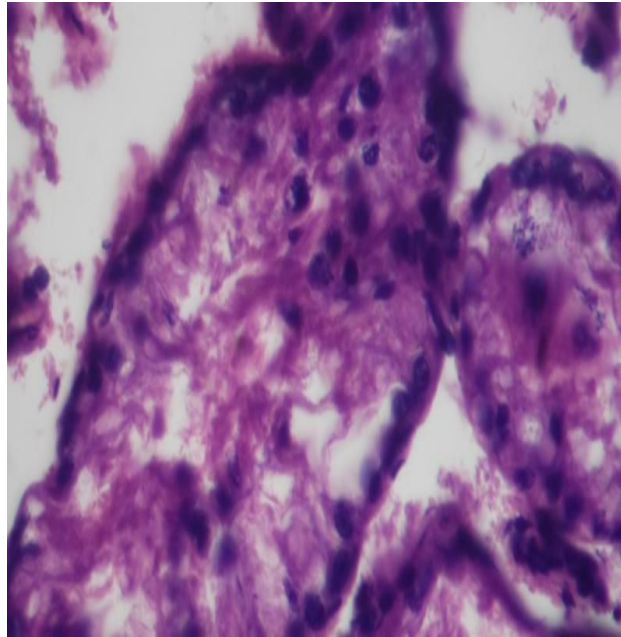
A análise histológica dos testículos de ratos submetidos ao procedimento piloto para verificação do dano testicular após orquidopexia mostrou que com 15 dias de orquidopexia os testículos apresentavam alteração importante da espermatogênese classificados como hipoespermatogênese (Figuras 7 e 8).

Figura 7 – Túbulo seminífero normal (com os elementos da espermatogênese preservados) HE 400x.



Fonte: próprio autor

Figura 8 – Histologia (14 dias de orquidopexia). Elementos celulares da espermatogênese encontram-se diminuídos em quantidade. HE 400x.

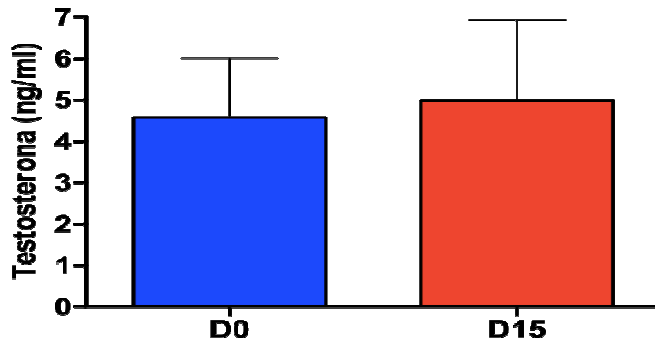


Fonte: próprio autor

4.2 Efeito da Orquidopexia na Função Gonadal

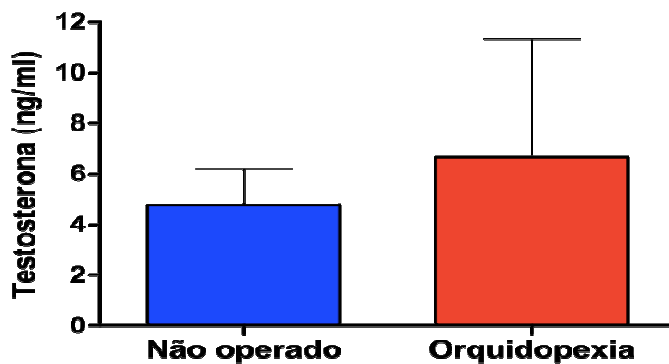
Não foi constatada diferença significativa ($p=0,4446$) entre a concentração sérica de testosterona mensurada em ratos após orquidopexia (D15) ($4,99 \pm 1,96\text{ng/ml}$) e a verificada em ratos não operados(D0) ($4,58 \pm 1,44\text{ng/ml}$) (GRUPO 4), e não foi constatada diferença significativa ($p = 0,36$) entre a concentração sérica de testosterona mensurada nos ratos submetidos a orquidopexia (D15)(GRUPOS 2 e 3) ($6,66 \pm 4,67\text{ng/ml}$) e a verificada nos animais não operados(D0)(GRUPO 1) ($4,75 \pm 1,45\text{ng/ml}$) (Figuras 9 e 10).

Figura 9 – Concentração sérica de testosterona mensurada imediatamente antes (D0) e 15 dias após a realização da orquidopexia (D15) nos mesmos ratos(GRUPO 4).



$p=0,4446$

Figura 10 – Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos não operados (GRUPO 1) e em animais submetidos a orquidopexia, 15 dias após a operação (GRUPO 2 e 3).



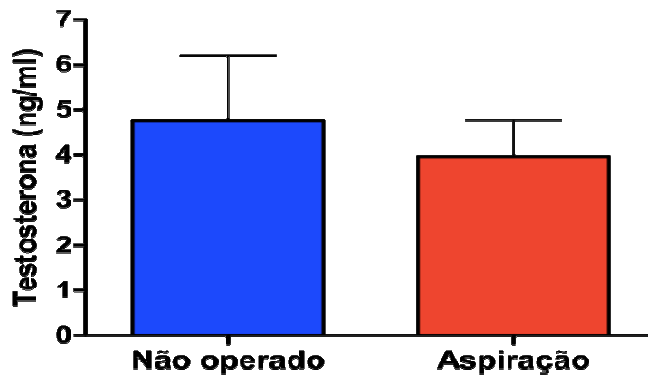
$p=0,36$

4.3 Efeito da Aspiração de Espermatozoides na Função Gonadal

Não foi observado diferença significativa ($p = 0,2710$) entre a concentração sérica de testosterona mensurada nos ratos submetidos a orquidopexia e aspiração ($3,96 \pm 0,80\text{ng/ml}$)(GRUPO 3)(D23) e a verificada nos animais não operados ($4,75 \pm 1,45\text{ng/ml}$)(GRUPO 1)(D0), assim como não foi constatada diferença significativa ($p = 0,2625$) entre a concentração sérica de testosterona mensurada nos ratos submetidos a orquidopexia e aspiração ($3,96 \pm$

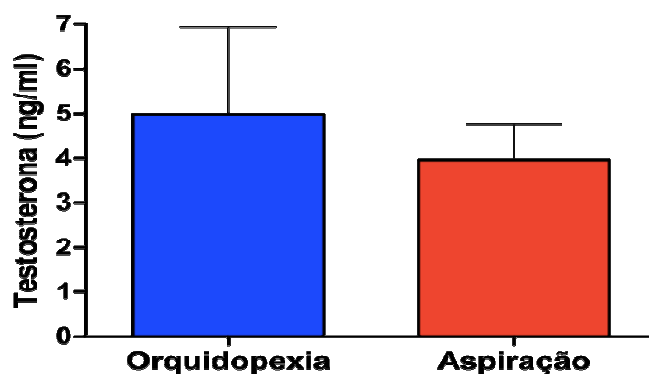
0,80ng/ml)(GRUPO 3)(D23) e a verificada nos animais submetidos a orquidopexia isolada ($4,99 \pm 1,96$ ng/ml)(GRUPO 4)(D15) (Figuras 11 e 12).

Figura 11 – Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos não operados (GRUPO 1)(D0) e em animais submetidos a orquidopexia e, posteriormente, a aspiração de espermatozoides do testículo (GRUPO 3)(D23).



$p = 0,2710$

Figura 12 – Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos submetidos a orquidopexia(GRUPO 4), 15 dias após a operação, e em animais submetidos a orquidopexia, e, subseqüentemente, a aspiração de espermatozoides do testículo, 8 dias após o procedimento(GRUPO 3)(D23).



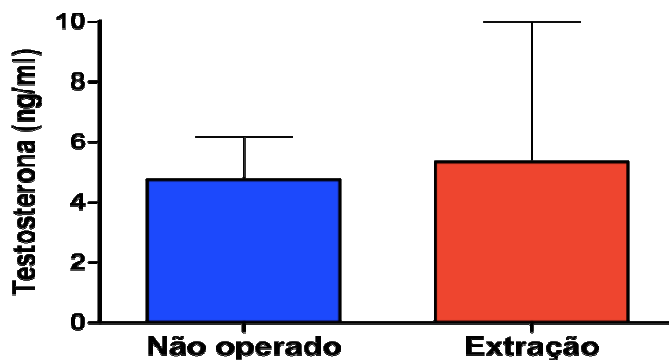
$p = 0,2625$

4.4 Efeito da Extração de Espermatozoides na Função Gonadal

Não foi constatada diferença significativa ($p = 0,7678$) entre a concentração sérica de testosterona mensurada nos ratos submetidos a

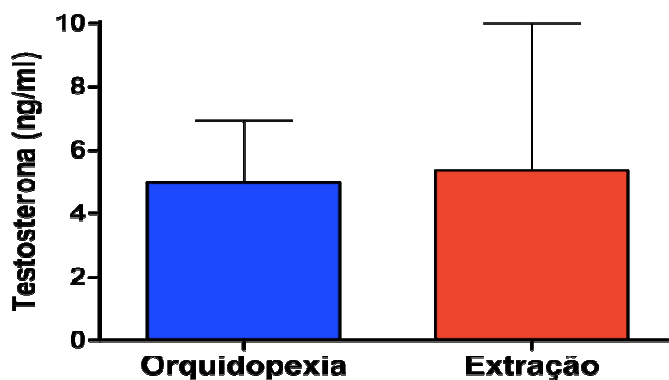
orquidopexia e extração ($5,35 \pm 4,65\text{ng/ml}$)(GRUPO 2)(D23) e a verificada nos animais não operados ($4,75 \pm 1,45\text{ng/ml}$)(GRUPO 1)(D0), assim como não foi constatada diferença significativa ($p = 0,8616$) entre a concentração sérica de testosterona mensurada nos ratos submetidos a orquidopexia e extração ($5,35 \pm 4,65\text{ng/ml}$)(GRUPO 2)(D23) e a verificada nos animais submetidos a orquidopexia isolada ($4,99 \pm 1,96\text{ng/ml}$)(GRUPO 4)(D15)(Figuras 13 e 14).

Figura 13 – Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos não operados(GRUPO 1)(D0) e em animais submetidos a orquidopexia e, posteriormente, a extração de espermatozoides do testículo(GRUPO 2)(D23).



$p = 0,7678$

Figura 14 – Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos submetidos a orquidopexia, 15 dias após a operação, e em animais submetidos a orquidopexia, e, subsequentemente, a extração de espermatozoides do testículo(D23).

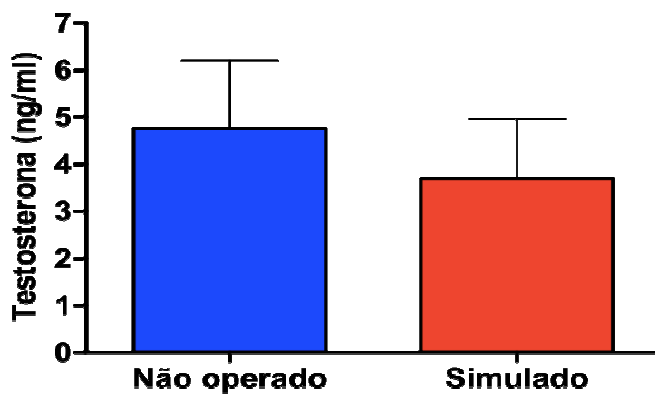


$p = 0,8616$

4.5 Efeito da Operação Simulada na Função Gonadal

Não foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,2111$) entre a concentração sérica de testosterona mensurada nos ratos submetidos a orquidopexia e operação simulada de captação de espermatozoides do testículo ($3,70 \pm 1,27\text{ng/ml}$)(GRUPO 4)(D23) e a verificada nos animais não operados ($4,75 \pm 1,45\text{ng/ml}$)(GRUPO 1)(D0)(Figura 15).

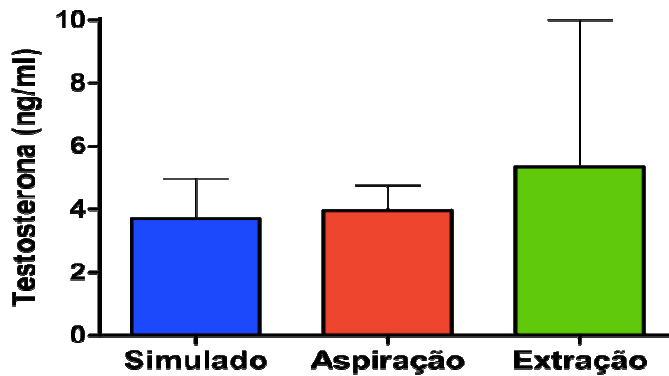
Figura 15 – Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos não operados(D0) e em animais submetidos a orquidopexia e, posteriormente, a operação simulada de captação de espermatozoides do testículo (Simulado)(D23).



$p = 0,2111$

Comparações entre os três grupos (Figura 16) foram feitas pela análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. Não foram constatadas diferenças significantes (ANOVA: $F = 0,5983$; $P = 0,5623$) entre as concentrações séricas de testosterona mensuradas nos ratos submetidos a operação simulada ($3,70 \pm 1,27\text{ng/ml}$), aspiração ($3,96 \pm 0,80\text{ng/ml}$) ou extração ($5,35 \pm 4,65\text{ng/ml}$).

Figura 16 – Concentração sérica de testosterona mensurada em ratos submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a operação simulada de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), a aspiração de espermatozoides do testículo ou a extração de espermatozoides do testículo, 8 dias após o procedimento.

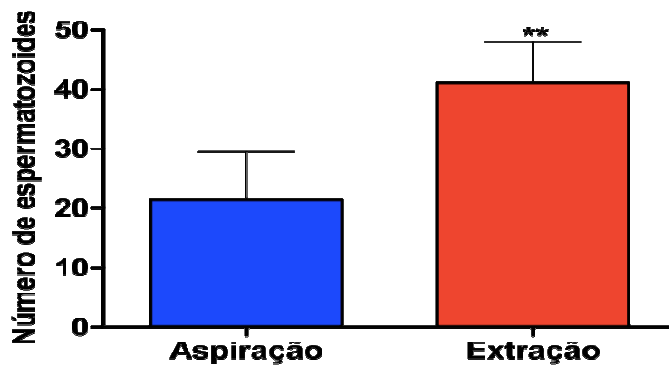


ANOVA: F = 0,5983; P = 0,5623

4.6 Avaliação da Captação de Espermatozóides

De acordo com a Figura 17 constatou-se que o número absoluto de espermatozóides captados pela técnica de extração ($41,00 \pm 7,01$) foi significativamente maior que o número de espermatozóides obtidos pela técnica de aspiração ($21,33 \pm 8,14$) ($p = 0,0012$).

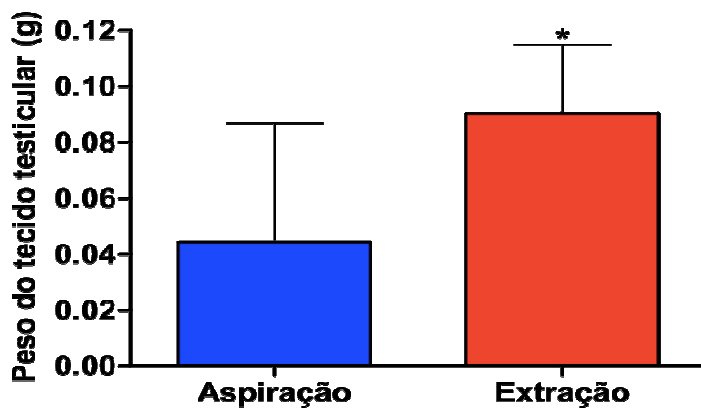
Figura 17 – Número bruto de espermatozoides captados pelas técnicas de aspiração e extração.



$p = 0,0012$

Quando se avaliou o peso testicular (Figura 18), em gramas, extraídos pelas técnicas de extração e aspiração foi constatado que o peso do tecido testicular obtido pela técnica de extração ($0,09 \pm 0,02\text{g}$) foi significativamente maior que aquele obtido pela técnica de aspiração ($0,04 \pm 0,04\text{g}$) ($p= 0,0452$).

Figura 18 – Peso do tecido testicular, em gramas, captado pelas técnicas de aspiração e extração.



$p= 0,0452$

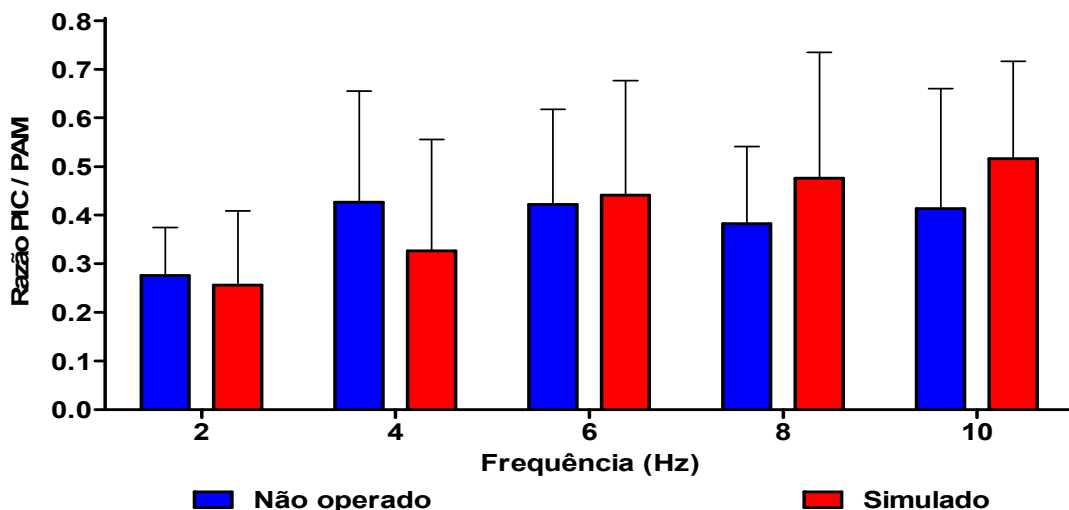
4.7 Efeitos da Captação de Espermatozóides na Função Erétil

A Tabela 2 e a Figura 19 mostram que não foram constatadas diferenças significantes entre os grupos (GRUPO 1 e GRUPO 4) em relação à razão PIC/PAM em nenhuma das frequências avaliadas.

Tabela 2 – Avaliação da resposta erétil, por meio do cálculo da razão entre a pressão intracavernosa (PIC) e a pressão arterial média (PAM), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos não operados e em animais submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), 8 dias após a operação de orquidopexia.

Frequência (Hz)	Não operado (média ± DP)	Simulado (média ± DP)	Significância (Teste t)
2	0,28 ± 0,10	0,26 ± 0,15	P = 0,7949
4	0,43 ± 0,23	0,33 ± 0,23	P = 0,4662
6	0,42 ± 0,20	0,44 ± 0,24	P = 0,8803
8	0,38 ± 0,16	0,48 ± 0,26	P = 0,4703
10	0,41 ± 0,25	0,52 ± 0,20	P = 0,4496

Figura 19 – Avaliação da resposta erétil, por meio do cálculo da razão entre a pressão intracavernosa (PIC) e a pressão arterial média (PAM), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos não operados e em animais submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozóides do testículo (Simulado), 8 dias após a operação de orquidopexia.

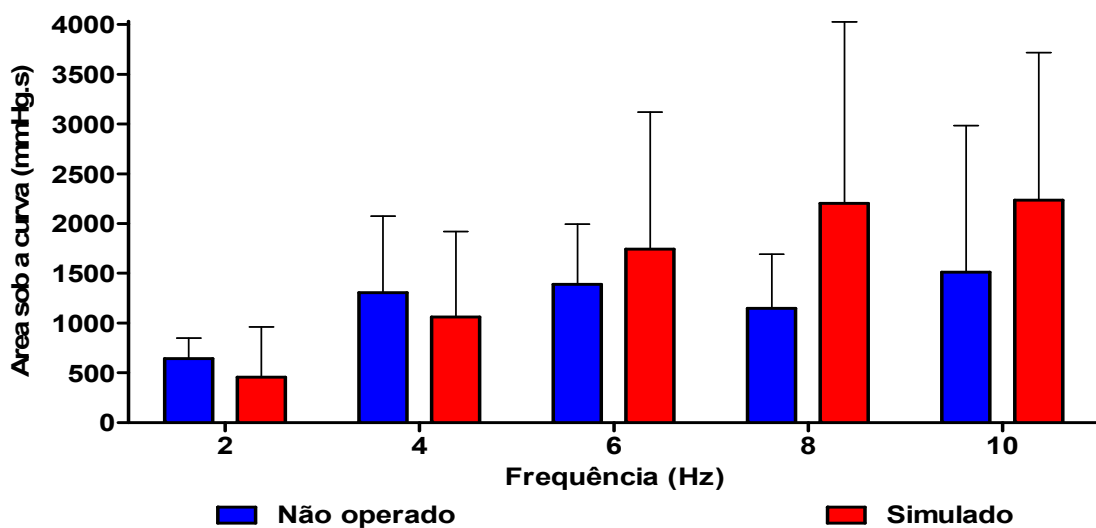


A Tabela 3 e a Figura 20 mostram que não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (GRUPO 1 e GRUPO 4) em relação à ASC em nenhuma das frequências avaliadas.

Tabela 3 – Avaliação global da resposta erétil, por meio da determinação da área sob a curva (ASC, expressa em mmHg.s) da pressão intracavernosa (PIC, em mmHg) versus o tempo (segundos), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos não operados e em animais submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), 8 dias após a operação de orquidopexia.

Frequência (Hz)	Não operado (média ± DP)	Simulado (média ± DP)	Significância (Teste t)
2	645,15 ± 205,22	458,04 ± 504,13	P = 0,4194
4	1305,43 ± 770,01	1062,53 ± 858,51	P = 0,6171
6	1390,43 ± 604,79	1743,84 ± 1376,12	P = 0,5774
8	1149,17 ± 542,79	2203,15 ± 1822,96	P = 0,2045
10	1512,42 ± 1472,38	2235,44 ± 1484,15	P = 0,4167

Figura 20 – Avaliação global da resposta erétil, por meio da determinação da área sob a curva (ASC, expressa em mmHg.s) da pressão intracavernosa (PIC, em mmHg) versus o tempo (segundos), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos não operados e em animais submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), 8 dias após a operação de orquidopexia.

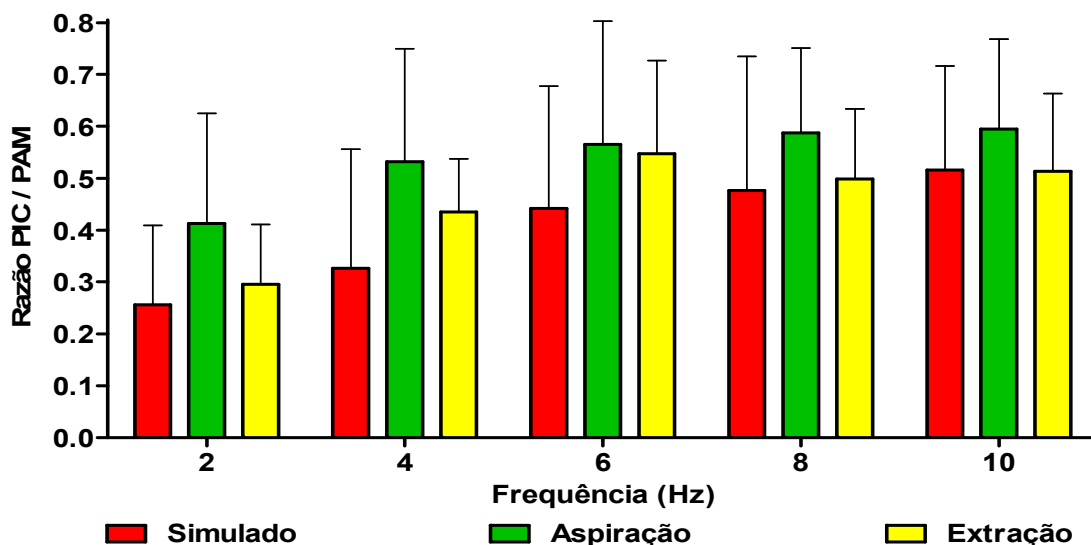


Comparações entre os três grupos (GRUPO 4, GRUPO 2 e GRUPO 3) foram feitas pela análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação à razão PIC/PAM em nenhuma das frequências avaliadas, segundo Tabela 4 e Figura 21 abaixo.

Tabela 4 – Avaliação da resposta erétil, por meio do cálculo da razão entre a pressão intracavernosa (PIC) e a pressão arterial média (PAM), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), a aspiração de espermatozoides do testículo e a extração de espermatozoides do testículo, 8 dias após a operação de orquidopexia.

Frequência (Hz)	Simulado (média ± DP)	Aspiração (média ± DP)	Extração (média ± DP)	Significância (ANOVA)
2	0,26 ± 0,15	0,41 ± 0,21	0,30 ± 0,12	P = 0,2635
4	0,33 ± 0,23	0,53 ± 0,22	0,44 ± 0,10	P = 0,2140
6	0,44 ± 0,24	0,56 ± 0,24	0,55 ± 0,18	P = 0,5840
8	0,48 ± 0,26	0,59 ± 0,16	0,50 ± 0,14	P = 0,5812
10	0,52 ± 0,20	0,60 ± 0,17	0,51 ± 0,15	P = 0,6655

Figura 21 – Avaliação da resposta erétil, por meio do cálculo da razão entre a pressão intracavernosa (PIC) e a pressão arterial média (PAM), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10Hz, em ratos submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), a aspiração de espermatozoides do testículo e a extração de espermatozoides do testículo, 8 dias após a operação de orquidopexia.

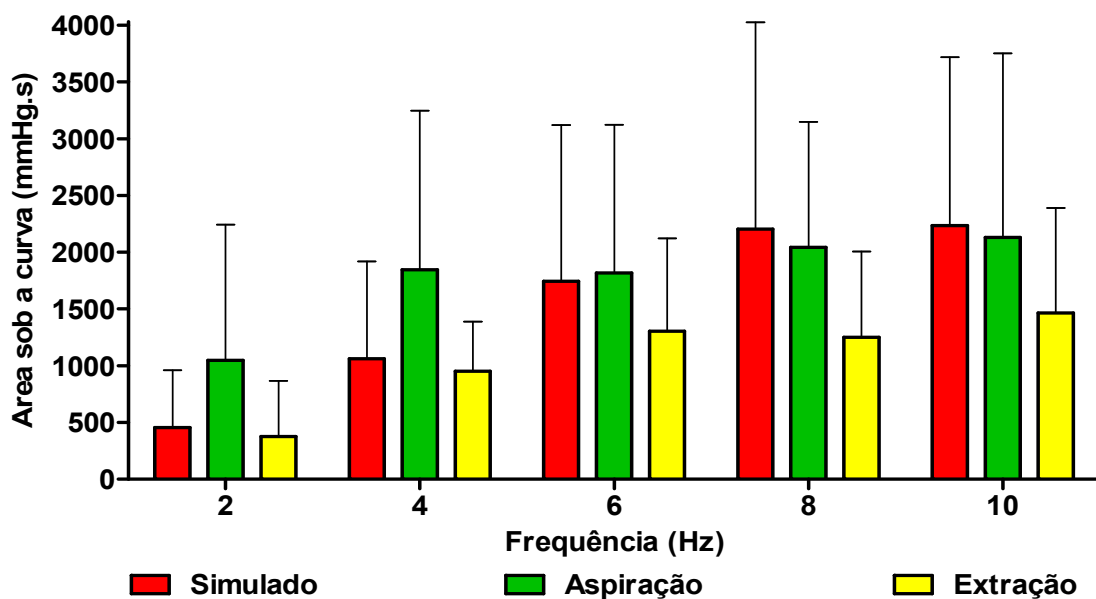


A Tabela 5 e a Figura 22 mostram que não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação à ASC em nenhuma das frequências avaliadas.

Tabela 5 – Avaliação global da resposta erétil, por meio da determinação da área sob a curva (ASC, expressa em mmHg.s) da pressão intracavernosa (PIC, em mmHg) versus o tempo (segundos), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), a aspiração de espermatozoides do testículo e a extração de espermatozoides do testículo, 8 dias após a operação de orquidopexia.

Frequência (Hz)	Simulado (média ± DP)	Aspiração (média ± DP)	Extração (média ± DP)	Significância (ANOVA)
2	458,04 ± 504,13	1046,10 ± 1197,50	376,39 ± 489,36	P = 0,3156
4	1062,53 ± 858,51	1846,80 ± 1399,95	952,88 ± 435,77	P = 0,2586
6	1743,84 ± 1376,12	1818,26 ± 1304,84	1304,20 ± 819,18	P = 0,7271
8	2203,15 ± 1822,96	2044,45 ± 1103,29	1252,05 ± 756,75	P = 0,4222
10	2235,44 ± 1484,15	2131,25 ± 1620,95	1465,09 ± 925,36	P = 0,5865

Figura 22 – Avaliação global da resposta erétil, por meio da determinação da área sob a curva (ASC, expressa em mmHg.s) da pressão intracavernosa (PIC, em mmHg) versus o tempo (segundos), após estimulação elétrica do nervo cavernoso nas frequências de 2, 4, 6, 8 e 10 Hz, em ratos submetidos a orquidopexia e, subsequentemente, a procedimento simulado de captação de espermatozoides do testículo (Simulado), a aspiração de espermatozoides do testículo e a extração de espermatozoides do testículo, 8 dias após a operação de orquidopexia.



Houve perda de 2 animais durante os experimentos. Um rato do GRUPO 2 foi excluído por apresentar infecção de ferida cirúrgica e um rato do GRUPO 3 faleceu, durante a observação, após a orquidopexia, de causa desconhecida.

5 DISCUSSÃO

Escolheu-se como animal de experimentação para este trabalho o rato adulto com peso entre 320 e 370 g e com idade por volta dos 200 dias de vida, tendo em vista que a maturidade sexual do rato se dá por volta de 50 dias de nascimento, e sua capacidade reprodutiva máxima fica entre 100 e 300 dias de vida (SIMÃO, 2000).

Tendo em vista que só são submetidos a captação de espermatozoides testiculares homens com alteração importante da espermatogênese, estes experimentos, neste estudo, só teriam sentido se fossem realizados em ratos com alteração da espermatogênese. Existem alguns modelos descritos para promover falha na espermatogênese como o uso de quimioterápicos (BUCCI AND MEISTRICH, 1987), ou indução de criptorquidia medicamentosa (MANNING *et al.*, 2001), ou cirúrgica (KERR *et al.*, 1988; JEGOU *et al.*, 1983). Decidiu-se por orquidopexia experimental por ser de fácil execução e baixo custo.

Vários investigadores descreveram mudanças degenerativas em testículos de ratos com criptorquidia, implicando que este tipo de modelo animal pode ser utilizado com este propósito (AGARWALA AND MITRA, 1996; KOGAN *et al.*, 1987; SRINIVAS *et al.*, 1998; ZAKARIA *et al.*, 1998; ALTAY *et al.*, 2000). Rossi *et al.* (2005) utilizaram este modelo de indução de criptorquidia e mostraram que a análise histológica de testículos criptorquídicos, induzidos cirurgicamente, apresentavam falha no processo de espermatogênese, encontrando síndrome de Sertolionly e parada de maturação após um período de 15 dias. Após 7 dias, os testículos se mostraram semelhantes ao grupo controle. Este estudo mostrou ainda uma redução no peso testicular dos ratos criptorquídicos quando comparados com os controles. No presente estudo observou-se visualmente, e claramente, uma redução dos volumes testiculares dos ratos criptorquídicos, com alteração na espermatogênese após 15 dias de criptorquidia. No entanto, já foi observado alterações leves na espermatogênese após 7 dias.

Como este trabalho inclui a dosagem de testosterona sérica no rato, é importante saber que a mesma apresenta variações significativas a curtos períodos e sofre influência de vários fatores. Sodersten *et al.* (1980) observaram que os níveis séricos de andrógenos de amostras colhidas a cada hora em ratos machos variavam

bastante, ocasionalmente chegando a haver uma variação de até 10 vezes entre os níveis inferior e superior. Estes mesmos autores encontraram evidências de que pulsos endógenos na concentração de andrógenos sofriam influência do ciclo luz/escuridão, com conseqüentes elevações séricas de andrógenos principalmente por volta das 9 horas, quando comparado ao período inverso, ou seja, por volta das 21 horas. A concentração de testosterona foi maior durante a fase de luz do que na fase de escuridão e foi maior sob a luz constante do que sob escuridão constante, embora de maneira não significativa. Nesse estudo, na tentativa de controlar essa variação, os ratos foram mantidos em ciclos claro/escuro (12/12h) e todas as coletas do experimento foram realizadas no período compreendido entre 8 e 10 horas da manhã, período esse que geralmente ocorre maior produção de andrógenos no rato.

A dosagem de testosterona sérica faz parte da rotina laboratorial há mais de duas décadas, com indicações e utilidades bem definidas, estando disponível na maioria dos laboratórios clínicos. Esta disponibilidade foi possível pelo desenvolvimento de metodologias simples e diretas, adaptáveis a plataformas de dosagem automatizada. A metodologia de referência é fundamentada em cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massa em tandem (WANG *et al.*, 2004). Devido a complexidade do processo pré-dialítico e a necessidade de equipamentos especiais, de alto custo, ficou limitado a laboratórios de pesquisa ou de referência. O uso generalizado dessas novas metodologias trouxe vantagens em termo de disponibilidade e custos, mas ao mesmo tempo suas limitações tornaram-se manifestas e várias publicações começaram a chamar a atenção para a falta de acurácia, em especial em baixas concentrações (mulheres e crianças) (VIEIRA *et al.*, 2008). O método utilizado, no presente estudo, para dosagem de testosterona foi a quimioluminescência, por ser o método disponível em nosso local de pesquisa. Todos os cuidados foram tomados para se evitar limitações metodológicas como calibragem prévia do aparelho, dosagens em duplicata, e coleta de sangue em ratos normais (piloto). Além disto, as dosagens encontradas nos ratos estudados foram compatíveis com os níveis encontrados em homens, isto é, não foram constatadas concentrações baixas, o que poderia reduzir a acurácia do método.

No presente estudo, a coleta de sangue para dosagem de testosterona foi realizada por meio da punção do seio venoso retro-orbital. Este tipo de coleta foi muito utilizado por pesquisadores no passado por ter a vantagem de ser método de

fácil aprendizado e fornecer uma boa quantidade de sangue para análise. Porém alguns pesquisadores têm se preocupado com os possíveis efeitos adversos do método. Embora alguns estudos tenham mostrado que as repetidas punções não alteram o ritmo diurno dos animais (BEYNEN *et al.*, 1988; VAN HERK *et al.*, 1997), outros estudos mostraram anormalidades clínicas e sinais de desconforto nos animais (MACGEE *et al.*, 1979; LE NET *et al.*, 1994). Embora saibamos que as localizações para coleta de sangue mais recomendadas atualmente nos ratos são a veia lateral da cauda, a veia sublingual, e a veia lateral do tarso (DIEHL *et al.*, 2001), infelizmente, não tínhamos em nosso centro de pesquisa ninguém com experiência na coleta de sangue nestes locais. Apesar disto, não observou-se qualquer efeito adverso aparente nos ratos estudados utilizando a coleta de sangue no seio venoso retro-orbital.

Está bem estabelecido que a criptorquidia induzida cirurgicamente (orquidopexia experimental) no rato leva a falha na espermatogênese (JONES *et al.*, 1977; JEGOU *et al.*, 1983), porém seus efeitos na esteroidogênese só foram elucidados alguns anos depois. Kerret *et al.* (1979) mostraram hipertrofia das células de Leydig acompanhado por aumento do número de retículo endoplasmático liso e mitocôndrias, que estão envolvidos na secreção de andrógenos. Em 1988, este mesmo autor submeteu ratos adultos a orquidopexia unilateral por 1,2 e 4 semanas e estudou as alterações morfológicas das células de Leydig usando abordagem morfométrica do volume e número de células de Leydig por testículo, nos testículos abdominais e escrotais. Apesar de uma redução de volume do testículo criptorquídico em torno de 30 %, em 2 semanas de cirurgia, comparando com o testículo escrotal, o número e o volume de células de Leydig, além da dosagem sérica de testosterona, foram semelhantes. No presente estudo não foi constatada diferença significativa entre a concentração sérica de testosterona mensurada nos ratos submetidos a orquidopexia e a verificada nos animais não operados, deixando evidente que qualquer alteração dos níveis de testosterona, ocorrida após a coleta de sêmen, não poderia ser atribuída à orquidopexia.

Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) possibilita a fertilização e gravidez quando apenas uma pouca quantidade de espermatozóide está disponível, através da coleta cirúrgica de sêmen de homens azoospérmicos. Esta é a única maneira que estes homens têm de compartilhar seu material genético com sua descendência (DEVROEY *et al.*, 1995).

Vários métodos cirúrgicos de obter espermatozóides para fertilização têm se desenvolvido em vários centros. As principais abordagens são a extração testicular aberta de espermatozóides (TESE), e a aspiração percutânea de espermatozóides (PESA). Devido a produção de espermatozóides ser focal, a realização de múltiplas biópsias aumenta as chances de captá-los. Porém, estas biópsias abertas podem levar a vários efeitos colaterais por conta de sua aparente natureza traumática. Sangramento, inflamação, desvascularização e fibrose, podem causar danos irreversíveis ao testículo, produzindo complicações clínicas importantes como hipogonadismo (SHUFARO *et al.*, 2002).

Um novo procedimento de extração testicular de espermatozóides, utilizando microscópio (micro-TESE), em que os túbulos seminíferos são visualizados, foi desenvolvido (SCHLEGEL, 1999). A visualização direta dos túbulos e vasos é vantajoso, pois além de identificar túbulos que contêm mais células germinativas, permite a retirada de menores quantidades de tecido testicular, e diminui o risco de lesão vascular inadvertida. Foi relatado que a micro-TESE causa significativamente menos complicações agudas e crônicas que os procedimentos convencionais (RAMASAMY *et al.*, 2005). Estudo clínico mostrou uma diminuição na dosagem sérica de testosterona total em 2 pacientes submetidos a TESE convencional, em contraste a nenhuma diminuição ocorrida em pacientes submetidos a micro-TESE (OKADA *et al.*, 2002). No presente estudo a ideia inicial seria estudar o impacto da micro-TESE nos testículos de rato, porém a túnica albugínea do rato é extremamente fina (~0,5mm de espessura) dificultando tecnicamente sua execução.

Com o objetivo de avaliar a diminuição dos níveis séricos de testosterona após TESE, em homens azoospermicos, Manning *et al.* (1998) estudaram 15 pacientes com níveis normais de testosterona antes da TESE. A quantidade de tecido extraído foi proporcional ao volume testicular. As concentrações de testosterona diminuíram significativamente em todos os pacientes. A diminuição foi maior em pacientes que tiveram seis biópsias comparados com os que tiveram duas biópsias, e também foi maior naqueles pacientes sem espermatogênese remanescentes quando comparado com os pacientes que tiveram espermatozoides extraídos. Estes achados sugerem que candidatos a TESE sofrerão de deficiência de testosterona mais frequentemente que homens férteis.

Manning *et al.* (2001) realizaram estudo que mais uma vez avaliava as alterações na testosterona sérica de animais submetidos a biópsia testicular. Neste estudo foram utilizados ratos normogonádicos e criptorquídicos. O principal objetivo era verificar se as alterações na testosterona se correlacionavam mais com a quantidade de tecido extraído ou com a quantidade de biópsias realizadas, além de verificar se a anestesia e a exploração escrotal sozinha poderia ser capaz de causar alterações na testosterona. Os autores encontraram que houve uma redução da concentração de testosterona nos ratos submetidos a extração de espermatozoides, e que esta diminuição foi claramente relacionada a quantidade de tecido extraído. Concluíram ainda que a anestesia não criou nenhuma alteração nos níveis de testosterona, e que a exploração escrotal provocou um declínio nas concentrações de testosterona que foi significativamente menor que a diminuição após a extração tecidual.

No presente estudo não foi constatada diferença significativa entre a concentração sérica de testosterona mensurada nos ratos submetidos a orquidopexia e extração, e a verificada nos animais não operados, assim como nos animais submetidos a orquidopexia isolada. Isto é, a extração de espermatozoides, em nosso estudo, não levou à diminuição dos níveis de testosterona. Isto pode ter sido devido a pequena quantidade de tecido extraído (peso médio de tecido extraído: 0,09g), apesar de que a quantidade de tecido extraído foi significativamente superior a quantidade de tecido obtido através da aspiração de espermatozoides. Outra provável justificativa é que a quantidade de tecido intersticial no rato é proporcionalmente superior ao encontrado em homens, e talvez fosse necessário maior quantidade de tecido extraído para provocar tal diminuição.

As técnicas de captação de espermatozoides por aspiração são praticadas em muitos centros de fertilidade em homens com azoospermia obstrutiva e não obstrutiva. Trabalho pioneiro foi realizado em 1988 quando uma aspiração de espermatozoides do epidídimo de homem com azoospermia obstrutiva levou à gravidez, através de fertilização *in vitro*, uma mulher (SILBER *et al.*, 1988). Estes procedimentos podem ser realizados sob anestesia local e são considerados menos invasivos que a TESE, mas o risco de dano testicular não pode ser desconsiderado.

Em estudo clínico realizado por Westlander *et al.* (2001) 35 homens azoospermicos foram submetidos a aspiração de espermatozoides testiculares (TESA), com agulha 19 gauge, e foram avaliados quanto a consequências

fisiológicas. Não houve nenhuma alteração significativa no FSH e testosterona após a cirurgia, e o volume testicular foi semelhante após 3 meses. Por outro lado, SHUFARO et al. (2002) em estudo experimental em modelo animal evidenciou que a aspiração de espermatozóides com agulha fina levou a severo, progressivo e irreversível dano à arquitetura testicular.

No presente estudo a aspiração de espermatozóides testiculares não causou alteração nos níveis de testosterona de ratos criptorquídicos. Não foi observado diferença significativa entre a concentração sérica de testosterona mensurada nos ratos submetidos a orquidopexia e aspiração e a verificada nos animais não operados, assim como a verificada nos animais submetidos a orquidopexia isolada. Mais uma vez acredito que a quantidade de tecido extraído por esta técnica não tenha sido suficiente para causar dano à esteroidogênese.

No que diz respeito à possibilidade de alteração nos níveis de testosterona apenas pela manipulação cirúrgica (GRUPO simulado), não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre a concentração sérica de testosterona mensurada nos ratos submetidos a orquidopexia e operação simulada de captação de espermatozóides do testículo e a verificada nos animais não operados.

Existem relatos na literatura da influência de vários anestésicos nos níveis séricos de testosterona. BARDIN AND PETERSON (1967) observaram uma queda dos níveis de testosterona plasmática 2 horas após a anestesia com éter etílico, provavelmente ocasionada por inibição do hormônio hipofisário, visto que a administração de hCG revertia esta queda. FARRIS et al. (1969) também estudaram a influência do éter sobre os níveis de testosterona plasmática e observaram uma queda a partir de 2 minutos após a administração do anestésico, sugerindo que esse gás teria uma ação direta sobre o testículo do rato. NAZIAN (1988) estudou em ratos a concentração sérica de hormônios ligados ao aparelho reprodutor, usando cloridrato de xilasina, tiamilal, tiopental, pentobarbital, ketamina e éter. A maioria destes agentes aparentemente causou redução dos níveis de testosterona nos ratos intactos e aumento nos ratos castrados, sugerindo uma inibição do andrógeno testicular e estimulação da secreção de andrógenos de origem adrenal. As drogas utilizadas neste estudo foram ketamina e xilazina.

Simão (2000) observou que a testosterona pós-operatória de ratos orquiectomizados sofre uma variação de 26,4 a 81,5% e seu nível basal inferior

(nadir) é constantemente elevado. Essa falha em levar a testosterona plasmática dos ratos castrados a níveis indetectáveis ou muito baixos já havia sido observada por outros autores (AMATAYAKUL *et al.*, 1971). Provavelmente essa elevação é devida aos hormônios de origem adrenal, visto que BARDIN AND PETERSON (1967) observaram aumento da secreção de testosterona e androstenediona proveniente dessas glândulas, após a castração de ratos, fato não observado em humanos (SANFORD *et al.*, 1977). Estes estudos podem justificar a falta de queda dos níveis de testosterona após os procedimentos de extração e aspiração de espermatozoides em nossos animais.

Os androgênios têm efeito modulador em múltiplas vias da função erétil, mas seu papel nessa área ainda se mantém incompletamente compreendido. Castração, medicamentosa ou cirúrgica, resulta em níveis praticamente negligenciáveis de testosterona no corpo e é usado como tratamento padrão para o câncer de próstata metastático (SMITH AND GUDZIAK, 1994). Tem sido mostrado que a depleção de testosterona tem resultado em um efeito deletério na função erétil devido mudanças negativas no tecido erétil peniano (NEHRA *et al.*, 1996).

Castração de coelhos provocou acúmulo de adipócitos na região subtúnica do pênis, sugerindo que ausência de testosterona promove a diferenciação de células estromais progenitoras em células gordurosas (TRAISH *et al.*, 2005). Uma outra mudança hipotética na estrutura peniana é a colagenização do tecido erétil (SIRAD *et al.*, 2011). O desequilíbrio resultante entre o músculo liso e colágeno resulta em uma perda da expansibilidade da musculatura lisa trabecular no corpo cavernoso, levando a disfunção veno-oclusiva.

A castração de ratos se mostrou excelente modelo de estudo de indução de disfunção erétil (PALESE *et al.*, 2003). Experimentos em ratos castrados mostraram uma diminuição da expressão e atividade da NOS neuronal e endotelial no corpo cavernoso, que está associado a uma diminuição na resposta ao estímulo do nervo cavernoso (PENSON *et al.*, 1995). Castração em ratos também resultou em diminuição da expressão e atividade da fosfodiesterase tipo 5 (ZANG *et al.*, 2005). Este efeito paradoxal da diminuição da atividade da fosfodiesterase tipo 5, levando a uma diminuição da degradação do cGMP, ainda não está totalmente compreendido, pois este efeito levaria a promoção da ereção.

A disfunção erétil tem sido associada com ansiedade, stress, e outros problemas médicos em homens inférteis (SHINDEL *et al.*, 2008). Ansiedade com

distúrbios hormonais podem estar associados com disfunção erétil em homens que se submetem a captação de espermatozoides testiculares para ICSI. AKBAL et al. (2009) investigaram os efeitos da TESE na função sexual de homens com fator masculino de infertilidade. Os pacientes foram avaliados através do Índice Internacional de Função Erétil-5 (IIEF-5), Escala ansiedade-depressão Hospitalar, e através da dosagem plasmática de testosterona. Estes autores mostraram que os pacientes que não obtiveram sucesso na TESE-ICSI tiveram um efeito negativo na função erétil devido a razões hormonais e psicológicas.

Como na literatura atual não havia nenhum estudo, em ratos, investigando os efeitos da captação de espermatozoides testiculares na função erétil, in vivo, decidiu-se incluir em nosso estudo esta avaliação. Para se avaliar a atividade erétil in vivo, adotamos dois parâmetros bastante utilizados na literatura, a razão ICP/MAP (pressão intracavernosa/pressão arterial média) e área sob a curva (AUC). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação à razão ICP/MAP, e nem no cálculo da AUC, em nenhuma das frequências avaliadas. Portanto, neste estudo, não houve impacto na função erétil de ratos submetidos a extração e aspiração de espermatozoides testiculares de ratos orquidopéxicos.

Como os ratos estudados não apresentavam nenhum fator de risco conhecido para disfunção erétil, exceto pela possibilidade de alteração hormonal, não foi surpresa o fato de não apresentarem alteração da função erétil, já que não houve alteração na função hormonal destes mesmos ratos. Outra explicação para este resultado vem de 2 artigos publicados que mostram que alterações na função erétil só ocorrem com redução importante dos níveis de testosterona plasmática (GUAY *et al.*, 2001; ZITZMANN *et al.*, 2006).

O dano testicular pode ser minimizado utilizando biópsia com agulha, quando comparado com biópsia aberta (ROSSI *et al.*, 2005). Entretanto, em casos difíceis de azoospermia não obstrutiva, onde a espermatogênese é muito escassa, a biópsia com agulha é muito menos provável de obter raros focos de espermatogênese para ICSI que a biópsia aberta (CRAFT *et al.*, 1997). Em um estudo, 14% dos pacientes com azoospermia não obstrutiva obtiveram sucesso na captação de espermatozoides com agulha, enquanto 63% dos pacientes tiveram sucesso na captação com biópsia aberta (EZEH *et al.*, 1998). A biópsia aberta é então preferida. O testículo de pacientes com azoospermia não obstrutiva

tipicamente é heterogêneo com respeito a espermatogênese; uma amostra simples para uma biópsia testicular diagnóstica falhou em predizer sucesso, ou falhou em subsequente TESE em mais de 15% dos pacientes. Uma vez que nenhuma localização particular no testículo é provável de se encontrar espermatozóides, múltiplas biópsias têm sido recomendadas (SILBER, 2000). Então múltiplas TESE têm sido o procedimento padrão para se obter espermatozóides para ICSI até recentemente.

No presente estudo optou-se por biópsias abertas múltiplas (3 em cada testículo) e obteve-se uma quantidade maior de espermatozóides quando comparado à técnica aspirativa. Apesar da maior quantidade de tecido extraído, na técnica aberta, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes quando comparamos o impacto na função gonadal e erétil. Acreditamos que, apesar das diferenças entre humanos e ratos, possamos extrapolar nossos achados a nossa prática clínica.

Como em outros estudos envolvendo sacrifício de animais, o número de ratos avaliados acaba por ser uma limitação neste estudo. Por motivos éticos, limitou-se a amostragem a um número mínimo necessário para uma avaliação estatística confiável. Este número reduzido de ratos estudados também pode ser justificado pela dificuldade técnica na realização da monitorização da pressão intracavernosa in vivo, que foi procedimento de difícil curva de aprendizado.

Uma outra limitação do estudo foi a utilização de método automático para avaliação da dosagem dos níveis séricos de testosterona (quimioluminescência), pois sabemos que existe certa limitação desta metodologias, podendo os valores obtidos estarem hiperestimados. Infelizmente, esta metodologia era a que o centro de pesquisa oferecia, mas foram tomados todos os cuidados para minimizar os erros.

Outra limitação no presente estudo foi a não realização da dosagem de testosterona inicial (antes das intervenções) nos ratos dos grupos experimentais 2 e 3, o que dificultou de certa forma a análise estatística.

São múltiplas as abordagens para captar espermatozóides. O desenvolvimento da técnica de microdissecção testicular para extração de espermatozóides por SCHLEGEL (1999) permitiu uma melhora nas taxas de captação de espermatozóides com menos dano testicular que a biópsia testicular aberta padrão. Apesar desta melhora técnica focos de espermatogênese não são

encontrados em todos os casos. Localizar estas ilhas produtoras de espermatozoides pode demandar bastante tempo (RAMASAMY et al., 2011). O desenvolvimento de técnicas para melhorar a identificação destes limitados focos, melhorando as taxas de sucesso na captação, diminuindo o tempo operatório, e reduzindo o volume de tecido extraído, é o foco de pesquisas futuras.

CONCLUSÃO

A captação de espermatozoides do testículo de ratos orquidopéxicos seja por técnica de extração ou aspiração não alterou a função gonadal e erétil do animal. A quantidade de espermatozoides captados na técnica de extração foi maior que na técnica aspirativa.

REFERÊNCIAS

- AGARWALA, S. AND MITRA, D.K. Fertility and unilateral undescended testis in the rat model. **PediatrSurg Int.**,v.11,p.266–268,1996.
- AKBAL, C.; MANGIR, N.; TAVUKÇU, H.H.; OZGUR, O. AND SIMSEK,F. Effect of testicular sperm extraction outcome on sexual function in patients with male factor infertility. **Urology**, v. 75, p. 598-602, 2010.
- AL BURNETT. General use of animal models for investigation of the physiology of erection. **Int Journal of Impotence Research**, v. 13, p. 135-139, 2001.
- ALTAY, B.; HEKIMGIL, M.; KEFI, A.; GIRGIN, C. AND CIKLI, N. A comparison of the histopathological findings after open and percutaneous needle testicular biopsy in adult male rats. **BJU Int.**, v.86,p.1084–1087, 2000.
- AMATAYAKUL, K.; RYAN, R.; UOZOMI, T.; ALBERT, A. A reinvestigation of testicular-anterior pituitary relationships in the rat: Effects of castration and cryptorchidism. **Endocrinology**, v. 88, p. 872-8, 1971.
- ARAÚJO, A.C.O. E BARROSO L.V.S. **Infertilidade Conjugal**.Em : Urologia para Graduação. Editado por Gonzaga LFS, Cerqueira JBG, Regadas RP, e col. Fortaleza: Edições UFC, p. 155-170, 2008.
- ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3. ed. Oxford: Blackwell, p. 620, 1994.
- AVERSA, A.; ISIDORI, A.M.; DE MARTINO, M.U.; et al. Androgens and penile erection: evidence for a direct relationship between free testosterone and cavernous vasodilation in men with erectile dysfunction. **ClinEndocrinol (Oxf)**,v.53,p.517-522, 2000.
- AVERSA, A; ISIDORI, A.M.; SPERA, G.; LENZI A, F. A. Androgens improve cavernous vasodilation and response to sildenafil in patients with erectile dysfunction. **Clin Endocrinol**,v.58,p.632-638, 2003.
- AZIZ, N. The importance of semen analysis in the context of azoospermia. **Clinics**, v. 1, p. 35-8, 2013. ISSN 1980-5322 (Electronic) 1807-5932 (Linking).
- BARDIN, C. AND PETERSON, R.E. Studies of androgen production by the rat: testosterone and androstenedione content of blood. **Endocrinology**, v. 80, p. 38-44, 1967.
- BECKER, A.J.; UCKERT, S.; STIEF, C.G.; et al. Cavernous and systemic testosterone plasma levels during different penile conditions in healthy males and patients with erectile dysfunction. **Urology**,v.58,p.435-440, 2001.

BEYNEN, C.; BAUMANS, V.; HAAS, J.W.M.; VAN HELLEMOND, K.K.; STAUFLOU, F.R.; VAN TINTELEN, G. **Assessment of discomfort induced by orbital puncture in rats**. In *New Developments in Biosciences: their Implications for Laboratory Animal Science*, Beynen AC, Solleveld HA (eds). MartinusNijhoff: Dordrecht, NL, p.431–436,1988.

BUCCI, L.R. and MEISTRICH, M.L. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. **Mutat Res**, v.176, p. 259, 1987.

BURNETT, A.L.; TILLMAN, S.L.; CHANG, T.S.; EPSTEIN, J.I.; LOWENSTEIN, C.J.; BREDDT, D.S.; SNYDER, S.H.; WALSH, P.C. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. **J Urol.**, v.150,n.1,p.73-6, 1993.

CAROPPO, E. **Male hypothalamic-pituitary-gonadal axis**. In: *Infertility in the male*. Edited by Lipshultz, Larry I., Howards, Stuart S., Niederberger, Craig S. Fourth edition. Cambridge University Press, p. 14-29, 2009.

COHAN, P.; KORENMAN, S.G. Erectile dysfunction. **J ClinEndocrinolMetab.**; v.86,p.2391-2394,2001.

COLLINS, W.P. Problems with a radioimmunoassay for testosterone. **J. Reprod. Fert.**, v. 33, p. 357-9, 1973.

CORONA, G.; MANNUCCI, E.; RICCA, V.; ET AL. The age-related decline of testosterone is associated with different specific symptoms and signs in patients with sexual dysfunction. **Int J Androl**, v. 32,p.720–8, 2009.

CORPECHOT, C.; EYCHENNE, B.; ROBEL, P. Simultaneous radioimmunoassay of testosterone, dihydrotestosterone, 5 alpha-androstane-3alpha, 17beta-diol and 5 alpha-androstane-3beta, 17betadiol in plasma of adult male rats. **Steroids**, v. 29, p. 503-16, 1977.

CRAFT, I.; TSIRIGOTI, S.; COURTLAUD, E. AND FARRER-BROW, G. Testicular needle aspiration as an alternative to biopsy for the assessment of spermatogenesis. **Hum. Reprod.**, v.12, p.1483-1487,1997.

DEAN, R.C. & LUE T.F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. **UrolClin North Am.**, v.4,p.379-95, 2005.

DE GROAT, W. AND BOOTH, A. **Neural control of penile erection**. London: Hawood., p. 465-513, 1993.

DEVROEY, P.; UBALDI, F.; LIU, J.; NAGY, Z.; TOURNAYE, H.; CAMUS, M.; VAN STEIRTEGHEM, A. Indications for and results of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Int J Androl.**, v. 2, p.88-90,1995.

DIEHL, K.H.; HULL, R.; MORTON, D., et al. A good practice guide of the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology**, v.21, p.15-23, 2001.

ECKHARD, C. Untersuchungen über die Erektion des Penis beim Hund. **Beitr Anat Physiol**, v. 3, p. 123-126.

ELLIS, W.J.; GRAYHACK, J.T. Sexual function in aging males after orchietomy and estrogen therapy. **J Urol.**, v.89, p.895-899, 1963.

EZEH, V.I.O.; MOORE, H.D.M. AND COOKE, I.D. A prospective study of multiple needle biopsies versus a single open biopsy for testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. **Hum. Reprod.**, v.13, p.3075-3080, 1998.

FARRIS, B.; HURLEY, T.J.; HANE, S.; FORSHAM, P.H. Reduction of testicular testosterone in rats by ether anesthesia. **Endocrinology**, v. 84, p. 940-2, 1969.

GOLDSTEIN, A.M.; MEEHAN, J.P.; ZAKHARY, R.; BUCKLEY, P.A.; ROGERS, F.A. New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. **Urology**, v.3, p.259-66, 1982.

GREENE, E.C. **Anatomy of the rat**. New York, Hafner, p.370, 1963.

GUAY, A.T.; PEREZ, J.B.; JACOBSON, J. AND NEWTON, R.A. Efficacy and safety of sildenafil citrate for treatment of erectile dysfunction in a population with associated organic risk factors. **Journal of Andrology**, v. 22, n.5, p. 793-797, 2001.

HALATA, Z.; MUNGER, B.L. The neuroanatomical basis for the protopathic sensibility of the human glans penis. **Brain Res.**, v.2, p. 205-30, 1986.

HEATON, J.P.W.; VARRIN, S.J. Effects of castration and exogenous testosterone supplementation in an animal model of penile erection. **J Urol.**, v.151, p.797-800, 1994.

ISHIKAWA, T.; NOSE, R.; YAMAGUSHI, K.; CHIBA, K. AND FUJIKAWA, M. Learning curves of microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia. **Fertility and Sterility**, v. 94, p.1008-1011, 2010.

JAROW, J.P. Clinical significance of intratesticular arterial anatomy. **J. Urol.**, v.145, p. 777-779, 1991.

JEGOU, B.; RISBRIDGER, G.P.; DE KRETZER, D.M... Effects of experimental cryptorchidism on testicular function in adult rats. **J. Androl.**, v. 4, n.1, p. 88-94, 1983.

JOHANNES, C.B.; ARAUJO, AB.; FELDMAN, H.A.; DERBY, C.A.; KLEINMAN, K.P.; MCKINLAY, J.B. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **J Urol.**, v.163, n.2, p.460-3, 2000.

JOHNSON, L.; PETTY, C.S.; NEAVES, W.B. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. **Biol. Reprod.**, v.22, p. 1233-43, 1980.

JONES, T.M., ANDERSON, W., FANG, V.S., LANDAU, R.L., ROSENFELD, R.L. Experimental cryptorchidism in adult male rats: histological and hormonal sequelae. **Anat. Rec.**, v.189,n.1,p. 1–27,1977.

JUNGWIRTH, A. et al. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. **EurUrol**,2012.

KARPMAN E AND WILLIAMS D. **Techniques of sperm retrieval**. In: Infertility in the male, 4th edition. Edited by: Lipshultz L I, Howards S S and Niederberger C S. Cambridge University Press; p. 407-420, 2009.

KELLY, D. A. Anatomy of baculum-Corpus Cavernosum interface in the Norway Rat (*Rattus norvegicus*), and implications for force transfer during copulation. **Journal of Morphology**, v. 244, p. 69-77, 2000.

KERR, J.B., RICH, K.A., DE KRETZER, D.M. Alterations of the fine structure and androgen secretion of interstitial cells in the experimentally cryptorchid rat testis. **Biol. Reprod**,v. 20,n.3,p. 409–422, 1979.

KERR, J.B.; RISBRIDGAR, G.P.; MURRAY, P.J.; KNELL, C.M. Effect of unilateral cryptorchidism on the intertubular tissue of the adult rats testis: evidence for intratesticular changes within the Leydig cells. **Int. J. Androl**, v. 11, n. 3, p. 209-23, 1988.

KOGAN, B.A.; GUPTA, R. AND JUENEMANN, K.P. Fertility in cryptorchidism: further development of an experimental model. **J Urol**, v.137,128–131, 1987.

KRANE, R.J.; GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. Impotence. **N Engl J Med**, v.24, p.1648-59, 1989.

KWAN, M.; GREENLEAF, W.J.; MANN, J.; CRAPO, L.; DAVIDSON, J.M. The nature of androgen action on male sexuality: a combined laboratory-self-report study on hypogonadal men. **J Clin Endocrinol Metab.**,v. 57,p.557–62, 1983.

LE NET, J.E.L.; ABBOTT, D.P.; MOMPON, R.P.; LEBLANC, B. Repeated orbital sinus puncture in rats induces damages to optic nerve and retina. *Vet. Pathol*, v. 31, p.621,1994.

LEWIN, A.; REUBINOFF, B.; PORAT-KATZ, A.; WEISS, D.; EISENBERG, V.; ARBEL, R.; BAR-EL, H. AND SAFRAN, A. Testicular fine needle aspiration: the alternative method for sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. **Hum Reprod.**,v.14,p.1785–1790, 1999.

LIEBERMAN, S. AND PRASAD, V.V.K. Heterodox notion on pathways of steroidogenesis. **Endocr. Rev.**, v.11,p. 469-93, 1990.

LIPSHULTZ, L.I.; THOMAS, A.J. AND KHERA, M. Surgical management of male infertility. In: **Campbell- Walsh Urology**, 9th ed. Edited by AJ Wein, LR Kavoussi and AC Novick. Philadelphia: Saunders Elsevier, vol 1, p. 654 –717, 2007.

LUGG, J.; NG, C.; RAJFER, J.; GONZALEZ-CADAVID, N. Cavernosal nerve stimulation in the rat reverses castration-induced decrease in penile NOS activity. **Am J Physiol**,v.271,p.354–61,1996.

MACGEE, N.; MARONPOT, R.R. Harderian gland dacryoadenitis in rats resulting from orbital bleeding. **Lab. Anim. Sci**, v. 29,p. 639–641, 1979.

MANNING, M.; HARTMUTH, S.; WEIDNER, W.; KLAUS, P.A.; JUNEMANN, P. Testosterone reaction after testicular biopsies- further investigation in the normogonad and cryptorchid rat model. **Urol Res**, v. 29, p. 173-177, 2001.

MANNING, M.; JUNEMANN, K.P.; ALKEN, P. Decrease in testosterone blood concentrations after testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men (letter). **Lancet**, v. 352, p. 37, 1998.

MEISEL, R.L; O'HANLON, J.K. AND SACHS, B.D. Differential maintenance of penile responses and copulatory behavior by gonadal hormones in castrated male rats. **HormBehav** , v. 18, p.56 -64, 1984.

MCCULLAGH, E.P.; RENSHAW, J.F. The effects of castration in the adult male. **JAMA**,v.103,p.1140-1143,1934.

MCKENNA, W.J.; ELLIOTT, P.M. Hypertrophic cardiomyopathy. **Evid Based Cardiovasc Med.**,v.4,p.89-91,1998.

MIKHAIL, N. Does Testosterone have a hole in Erectile Function? **The American Journal of Medicine** ,v. 119, p.373-382, 2006.

MIRONE, V.; IMBIMBO, C.; FUSCO, F.; ET AL: Androgens and morphologic remodeling at penile and cardiovascular levels: a common piece in complicated puzzles?.**EurUrol.**,v. 56,n.2,p.309-316, 2009.

MILLS, T.M.; STOPPER, V.S.; WIEDMEIER, V.T. Effects of castration and androgen replacement on the hemodynamics of penile erection in the rat. **BiolReprod.**,v.51,n.2,p.234-238, 1994.

MITCHELL ,J.; STEWART, J. Effects of castration, steroid replacement, and sexual experience on mesolimbic dopamine and sexual behaviors in the male rat. **Brain Res.**,v.491,p.116-127, 1988.

MOREIRA, E.D. JR.; ABDO, C.H.; TORRES, E.B.; LOBO, C.F.; FITTIPALDI, J.A. Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the Brazilian study of sexual behavior. **Urology**, v. 58,p.583-8, 2001.

MOREIRA, E.D. JR.; BESTANE, W.J.; BARTOLO, E.B.; FITTIPALDI, J.A. Prevalence and determinants of erectile dysfunction in Santos, southeastern Brazil. Sao Paulo. **Med J.**, v.120,p.49-54, 2002.

MOREIRA, E.D. JR.; LOBO, C.F.; VILLA, M.; NICOLOSI, A.; GLASSER, D.B. Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Salvador, northeastern Brazil: a population-based study. **Int J Impot Res.**, v.14, n. 2,p.3-9,2002.

MORI, H. AND CHRISTENSEN, K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. **J. Cell Biol.**, v. 84, p. 340-54, 1980.

MULLIGAN T, SCHMITT B. Testosterone for erectile failure. **J Gen Intern Med**, v. 8,n.9,p.517-521, 1993.

NAZIAN, S.J. Serum concentration of reproductive hormones after administration of various anesthetics to immature and young male rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 187, p. 482-7, 1988.

NEHRA, A.; GOLDSTEIN, I.; PABBY, A. ET AL. Mechanisms of venous leakage: a prospective clinicopathological correlation of corporeal function and structure. **J Urol**, v. 156, p.1320–9,1996.

NIH CONSENSUS CONFERENCE. IMPOTENCE. NIH Consensus Development Panel on Impotence. **JAMA**, v. 270,p.83-90, 1993.

O'CONNOR, D.B.; LEE, D.M.; CORONA, G.; ET AL. The relationships between sex hormones and sexual function in middle-aged and older European men. **J ClinEndocrinol Metab**,v.96,p.1577–87, 2011.

OSTAD, M.; LIOTTA, D.; YE, Z. AND SCHLEGEL, P.N. Testicular sperm extraction (TESE) for non-obstructive azoospermia: results of a multibiopsy approach with optimized tissue dispersion. **Urology**,v. 52, p.692–696,1998.

PALESE, M.A.; CRONE, J.K. AND BURNETT, A.L. A castrated mouse model of erectile dysfunction. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 5, p. 699-703, 2003.

PENSON, D.F.; NG, C.; CAI, L.; RAJFER, J.; GONZALEZ-CADAVID, N.F. Androgen and pituitary control of penile nitric oxide synthase and erectile function in the rat. **BiolReprod**,v. 55, p. 567–74,1995.

PINSKY, M.R.; GUR, S.; TRACEY, A.J.; HARBIN, A.; HELLSTROM, W.J. The effects of chronic 5-alpha-reductase inhibitor (dutasteride) treatment on rat erectile function. **J Sex Med**, v.8, p.3066–74, 2011.

PUECH-LEAO, P.; REIS, J.M.; GLINA, S. & REICHEL, A.C. Leakage through the crural edge of the corpus cavernosum: diagnosis and treatment. **Eur Urol.**, 13: 163-165,1987.

QUINLAN, D.M.; NELSON R.J.; PARTIN, A.W.; MOSTWIN, J.L. AND WALSH,P.C. The rat as a model for study of penile erection. **The Journal of Urology**, v.141, p.656-661, 1989.

RAMASAMY, R.; FISHER, E.S.; RICCI ,J.A.; ET AL: Duration of microdissection testicular sperm extraction procedures: relationship to sperm retrieval success. **J Urol**,v.185, p.1394,2011.

RAMASAMY, R.; STERLING, J.; FISHER, E.S.; JAIN, M.; ROBINSON, B.D.; SHERCHEK, M., HULAND, D.; XU, C.; MUKHERJEE, S. AND SCHLEGEL, P.N. Identification of spermatogenesis with multiphoton microscopy: an evaluation in a rodent model. **The Journal of Urology**,v. 186, p.2487-2492,2011.

RAMASAMY, R.; YAGAN, N.; SCHLEGEL, P.N. Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction. **Urology**, v. 65,p.1190-1194, 2005.

REILLY, C.M.; STOPPER, V.S.; MILLS, T. Androgens modulate the adrenergic responsiveness of vascular smooth muscle in the corpus cavernosum. **J Androl.**, v.18, p.26-31, 1997.

RHODEN, E.L.; TELOKEN, C.; SOGARI, P.R.; SOUTO, C.A. The relationship of serum testosterone to erectile function in normal aging men. **J Urol**, v.167, p.1745–8, 2002.

ROSSI, M.L.; PEREIRA, L.A.V.; SANTIS,L.; PASQUALOTTO,F..F.; IACONELLI JR.,A.; ORTIZ,V. and JUNIOR,E.B. Sperm retrieval techniques in rats with suppressed spermatogenesis by experimental cryptorchidism. **Human Reproduction**, v.20,n.2, p.443-447, 2005.

SAAD, R.D.; NEVES, P.A.; GLINA, S.; DANCONA, C.A.L.; DAMBROS, M. AND LÚCIO, M.A. Quantitative (Stereological) and qualitative study of rat epididym after vasectomy and percutaneous epididymal sperm aspiration. **The Journal of Urology**,v. 179,p. 381-384, 2008.

SAEZ, J.M. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. **Endocrine Rev.**, v. 15, p. 574-626, 1994.

SANFORD, E.J.; PAULSON, D.R.;DRAGO, J.R.; ROHNER, JR.; SANTEN, R.; BARDIN, C.J. The effects of castration on adrenal testosterone secretion in men with prostatic carcinoma. **J Urol.**, v. 118, p. 1019-21, 1977.

SATTAR, A.A.; WESPES, E.; SCHULMAN, C.C. Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. **EurUrol**, v.2,p.142-4, 1994.

SCHLEGEL, P.N. AND CHANG T.S.K. The testis, epididymis and ductus deferens. In Walsh, P.C., Retik, A.B., Stamey, T.W. and Vaughan, E.D. (eds), **Campbell's Urology**, 6th edn. W.B.Saunders, Philadelphia, p. 190, 1991.

SCHLEGEL, P.N.; AND SU, L.M. Physiological consequences of testicular sperm extraction. **Hum Reprod.**, v. 12, p.1688–1692, 1997.

SCHLEGEL, P.N. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. **Hum Reprod** , v.14, p. 131-135,1999.

SHINDEL, A.W.; NELSON, C.J.; NAUGHTON, C.K., ET AL. Sexual function and quality of life in the male partner of infertile couples: prevalence and correlates of dysfunction. **J Urol**,v.179,n.3, p.1056-1059. 2008.

SHUFARO, Y.; PRUS, D.; LAUFER, N. AND SIMON, A. Impact of repeated testicular fine needle aspirations (TEFNA) and testicular sperm extraction (TESE) on the microscopic morphology of the testis: an animal model. **Hum. Reprod.**,v.17, n.7 , p.1795-1799, 2002.

SIGMAN, M. AND JAROW, J.P. Male infertility. In: Campbell-Walsh Urology, 9th ed. Edited by AJ Wein, LR Kavoussi, AC Novick et al. **Philadelphia Saunders Elsevier**; vol 1, p. 609–653, 2007.

SILBER, S.J. AND RODRIGUEZ-RIGAU, L.J. Quantitative analysis of testicle biopsy: determination of partial obstruction and prediction of sperm count after surgery for obstruction. **Fertil. Steril.**, v. 36, p.480–485,1981.

SILBER, S.J.; BALMACEDA, J.; BORRERO, C. ET AL. Pregnancy with sperm aspiration from the proximal head of the epididymis: a new treatment for congenital absence of the vas deferens. **Fertil. Steril.**, v.50, p.525-528, 1988.

SILBER, S.J.; VAN STEIRTERGHEM, A.C.; LIU, J. ET AL. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicular biopsy. **Hum. Reprod.**, v.10, p.148-152, 1995.

SILBER, S.J. Microsurgical TESE and the distribution of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. **Hum. Reprod.**, v.15, p.2278–2284, 2000.

SIMÃO, O.P. **Efeitos da adrenalectomia bilateral com associação de gonadotrofina coriônica sobre os níveis plasmáticos da testosterona em ratos previamente castrados por duas técnicas diferentes.** 2000.58f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental. Universidade Federal de São Paulo, 2000.

SIRAD, E.; HLAING, S.; KOVANEZ, I., ET AL. Sildenafil promotes smooth muscle preservation and ameliorates fibrosis through modulation of extracellular matrix and tissue growth factor gene expression after bilateral cavernosal nerve resection in the rat. **J SexMed**,v. 8, p. 1048–60, 2011.

SMITH, A.Y. and GUDZIAK, M.R. Hormonal therapy for stage D cancer of the prostate. **West J Med**, v. 160, p.351–9, 1994.

- SMITH, R.P.; LOWE, G.J.; KAVOUSSI, P.K.; STEERS, W.D.; ET AL: Confocal Fluorescence Microscopy in a Murine Model of Microdissection Testicular Sperm Extraction to Improve Sperm Retrieval. **The Journal of Urology**, n.187,p.1918-1923, 2012.
- SODERSTEN,P.; ENEROTH,P.; EKBERG,P.H. Episodic fluctuations in concentrations of androgen in serum of male rats: possible relationship to sexual behavior. **J Endocrinol.**, v. 87, p. 463-71, 1980.
- SRINIVAS, M.; AGARWALA, S.; DATTA GUPTA,S.; DAS, S.N.; SHAHA, C. AND MITRA, D.K.Fertility and unilateral undescended testis in the rat model II. **PediatrSurgInt**, v. 13, p.392–395, 1998.
- STEERS, W.D; MALLORY, B. AND DE GROAT, W.C. Electrophysiological study of neural activity in penile nerve of the rat. **Am J Physiol**,v. 254, p.989 -1000, 1988.
- STORELU, S.; GREGOIRE, M.; GERARD, D., et al.. Neuroanatomical correlates of visually evoked sexual arousal in human males. **Arch Sex Behav**, v.28,p.1-21,1999.
- TRAISH, A.M.; PARK, K.; DHIR, V., ET AL: Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. **Endocrinology**, v.140, n..4, p.1861-1868, 1999.
- TRAISH, A.M.; SAAD, F.; GUAY, A. The dark side of testosterone deficiency: II. Type 2 diabetes and insulin resistance. **J Androl** ,v. 30,n.1, p.23-32, 2009.
- TRAISH, A.M.; TOSELLI, P.; JEONG, S.; KIM, N.N. Adipocyte accumulation in penile corpus cavernosum of the orchietomized rabbit: a potential mechanism for veno-occlusive dysfunction in androgen deficiency. **J Androl** , v.26,p. 242–8,2005.
- VAN HERCK,H.; DE BOER, S.F.; HESP, A.P.M.; VAN LITH, H.A.; BAUMANS, V.; BEYNEN, A.C. Orbital bleeding in rats while under diethylether anesthesia does not influence telemetrically determined heart rate, body temperature, locomotor activity and eating activity when compared with anesthesia alone. **Lab. Anim.**, v.31, p.271–278, 1997.
- VIEIRA, J.G.H.; NAKAMURA,O.H.; FERRE,C.M.; TACHIBANA,T.T.; ENDO,M.H.K.; CARVALHO,V.M. Importância da metodologia na dosagem de testosterona sérica: comparação entre um imunoensaio direto e um método fundamentado em cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massa em tandem. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.52, n.6, p. 1050-55, 2008.
- WALDKIRCH, E.; WALDKIRCH, E.; UCKERT, S.; SCHULTHEISS, D., ET AL: Non-genomic effects of androgens on isolated human vascular and nonvascular penile erectile tissue. **BJU Int**, v. 101, n.1, p.71-75, 2008.
- WALSH, P.C.; BRENDLER, C.B.; CHANG, T.; MARSHALL, F.F.; MOSTWIN, J.I.; STUTZMAN, R.; SCHLEGEL, P.N. Preservation of sexual function in men during radical pelvic surgery. **Md Med J.**, v.4, p.389-93,1990.

WANG,C.; CATLIN,D.H.; DEMERS, L.M.; STARCEVIC,B. AND SWERDLOFF, R.S. Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.82, n.2, p.534-543, 2004.

WESTLANDER, G.; EKERHOVD, E.; GRANBERG, S.; LYCKE, N.;NILSSON,L.;WERNER, C. AND BERG,C. Serial ultrasonography, hormonal profile and antisperm antibody response after testicular sperm aspiration. **Human Reproduction**, v. 16, n. 12, p. 2621-2627, 2001.

WILLIAN, G.D. AND BENJAMIN, D.S. The ischiourethralis muscle of the rat: Anatomy, innervation and function. **The Anatomical Record**, v.229, p. 203-208, 1991.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **WHO manual for the standardised investigation and diagnosis of the infertile couple**. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2000.

ZAKARIA, O.; SHONO, T.; IMAJIMA, T. AND SUITA, S. Fertility and histological studies of the contralateral testis in two different intra- and-extra-abdominal rat models of unilateral cryptorchidism. **Br J Urol**, v. 82, p.574–577,1998.

ZHANG, X.H.; MORELLI, A., LUCONI, M., ET AL. Testosterone regulates PDE5 expression and in vivo responsiveness to tadalafil in rat corpus cavernosum. **EurUrol**, v.47,p. 409–16, 2005.

ZITZMANN, M.; FABER, S. AND NIESCHLAG, E. Association of specific symptoms and metabolic risks with serum testosterone in older men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 11, p. 4335-4343, 2006.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DA CEPA



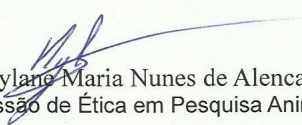
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 77/2012, sobre o projeto intitulado: **“ANÁLISE DO IMPACTO DA CAPTAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES DO TESTÍCULO DE ANIMAIS COM AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA: COMPARAÇÃO DA TÉCNICA CONVENCIONAL COM A MICROCIRURGIA”**, de responsabilidade do Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 26 de setembro de 2013.

Fortaleza, 26 de setembro de 2013


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA