



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Bruno Felix Patrício

**Alterações morfológicas no pênis de ratos hipertensos tratados com  
sildenafil, enalapril e sua combinação**

Rio de Janeiro

2014

Bruno Felix Patrício

**Alterações morfológicas no pênis de ratos hipertensos tratados com  
sildenafil, enalapril e sua combinação**

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

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Rio de Janeiro

2014

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

P314 Patrício, Bruno Félix.

Alterações morfológicas no pênis de ratos hipertensos tratados com sildenafil, enalapril e sua combinação / Bruno Félix Patrício. – 2014.  
120 f.

Orientador: Diogo Benchimol de Souza.

Coorientador: Francisco José Barcellos Sampaio.

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

1. Hipertensão - Teses. 2. Hipertensão - Complicações. 3. Pênis - Teses.  
4. Disfunção erétil - Etiologia. 5. Disfunção erétil - Teses. 6. Enalapril -  
Farmacocinética. 7. Sildenafil - Farmacocinética. I. De Souza, Diogo  
Benchimol. II. Sampaio, Francisco José Barcellos. III. Universidade do  
Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.12-008.331.1:611.63

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

---

Assinatura

---

Data

Bruno Felix Patrício

**Alterações morfológicas no pênis de ratos hipertensos tratados com sildenafil,  
enalapril e sua combinação**

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

Aprovado em 22 de outubro de 2014.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Carla Braga Mano Gallo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. João Paulo Martins de Carvalho

Hospital Federal Cardoso Fontes

Rio de Janeiro

2014

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese a minha filha, Morena Pastore Felix e a minha esposa Karina Silveira Pastore, que me deram inspiração, força e conforto nos momentos mais difíceis e compreenderam a importância desta Tese para nossas vidas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza, meu orientador, pelo tempo dedicado a orientação, pelos ensinamentos durante os anos de convivência, que certamente contribuíram para esta Tese, pelos agradáveis momentos de descontração dentro e fora do Laboratório de Pesquisa Urogenital que fortaleceu a amizade construída ao longo destes anos.

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio, meu coorientador, e Coordenador do Curso de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, pela oportunidade de participar do curso de pós-graduação e pelos ensinamentos durante os anos de convivência que certamente contribuíram para esta Tese.

Agradeço ao Prof. Dr. Waldemar Silva Costa pelos ensinamentos durante os anos de convivência, que certamente contribuíram para esta Tese e também para vida pessoal e profissional, pelos agradáveis momentos de descontração dentro e fora do Laboratório de Pesquisa Urogenital e pelos “puxões de orelha” que certamente valeram a pena.

Agradeço ao amigo Jorge Medeiros pela parceria neste e em outros estudos científicos, pelos agradáveis momentos de descontração dentro e fora do Laboratório de Pesquisa Urogenital que fortaleceu ainda mais a amizade construída durante 10 anos em que estivemos juntos no laboratório.

Agradeço aos colegas de laboratório, Fabiana, Michele, Carina, Gustavo, Damasceno, Marcelo, que estavam sempre prontos a ajudar quando preciso.

A sorte favorece a mente bem preparada.

*Louis Pasteur*

## RESUMO

FELIX-PATRÍCIO, Bruno. *Alterações morfológicas no pênis de ratos hipertensos tratados com sildenafil, enalapril e sua combinação.* 2014. 120f. Tese de Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A disfunção erétil é frequentemente associada à hipertensão arterial sistêmica e a drogas anti-hipertensivas, no entanto os aspectos morfológicos do pênis nestas situações são pouco conhecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar a morfologia do pênis dos ratos hipertensos tratados e não tratados com enalapril ou sildenafil isolados ou em combinação. Cinquenta ratos machos foram divididos em cinco grupos, cada um com 10 animais: grupo WKY, composto por ratos normotensos Wistar Kyoto; grupo H, composto de ratos espontaneamente hipertensos (SHR); grupo HE, composto por SHR tratados com enalapril (30 mg/kg/dia); grupo HS, composto de animais SHR tratados com sildenafil (1 mg/kg/dia); e grupo HES, composto por SHR tratados com enalapril e sildenafil. A pressão arterial foi aferida semanalmente, a partir de 90 dias de vida dos animais, durante todo experimento. No final do experimento, com 160 dias de vida, os ratos foram submetidos à eutanásia e seus pênis foram coletados para análise histomorfométrica. Os principais parâmetros analisados foram as áreas dos cortes transversais do pênis, túnica albugínea, corpo cavernoso e a densidade do músculo liso, espaço sinusoidal e tecido conjuntivo do corpo cavernoso. Ambos os grupos tratados com enalapril tornaram-se normotensos. Os animais do grupo H não apresentaram diferenças na área do corpo cavernoso em comparação com o grupo WKY; no entanto, os ratos tratados com enalapril ou sildenafil tiveram um aumento nesse parâmetro. O grupo HES não apresentou diferença em comparação com ratos normotensos. A densidade de tecido conjuntivo no corpo cavernoso aumentou, enquanto os espaços sinusoidais diminuíram nos ratos SHR não tratados. Todos os tratamentos foram eficazes em manter a densidade do tecido conjuntivo, em comparação com animais normotensos. A densidade de músculo liso foi semelhante em todos os grupos, com exceção do grupo terapia combinada, que demonstrou uma redução no músculo liso. Dessa forma, a hipertensão arterial sistêmica promoveu alterações estruturais nos corpos cavernosos, que pode estar relacionada com a disfunção erétil. Animais tratados com enalapril e sildenafil tiveram preservação da estrutura normal do corpo cavernoso e um aumento da área da secção transversa do pênis e do corpo cavernoso. A combinação dessas drogas mostrou ser menos benéfica do que o uso destes medicamentos de forma isolada.

Palavras-chave: Disfunção erétil. Hipertensão. Morfologia. Pênis. Enalapril. Sildenafil.

Rato

## ABSTRACT

FELIX-PATRÍCIO, Bruno. *Morphological alteration in hypertensive rat penis treated with sildenafil, enalapril and its combination.* 2014. 120f. Tese de Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Erectile dysfunction is frequently associated to systemic arterial hypertension and anti-hypertensive drugs, however the penile morphological aspects on these situations are poorly known. The objective of this study was to evaluate the penile morphology of untreated hypertensive rats and rats treated with enalapril or sildenafil alone or in combination. Fifty male rats were assigned into 5 groups, each with 10 animals: group WKY, with normotensive Wistar Kyoto rats; group H, with untreated spontaneously hypertensive rats (SHR); group HE with enalapril (30mg/Kg/day); group HS with SHR treated with sildenafil (1mg/Kg/day); and group HES, with SHR treated with enalapril and sildenafil. Blood pressure was measured weekly from 90 days of the animals' age, until the end of the experiment. At the conclusion of the study, with 160 days of age, the rats were submitted to euthanasia and their penises were collected for histomorphometrical analysis. The cross-sectional areas of the penis, tunica albuginea, and corpus cavernosum were measured. The density of the corpus cavernosum structures was quantified. Both groups of SHR rats treated with enalapril became normotensive. Animals from group H showed no difference in penile and cavernosal cross-sectional area compared to WKY rats. However, those rats treated with enalapril or sildenafil alone demonstrated an increase in these parameters. Rats of the group HES showed no cross-sectional area differences compared to normotensive rats. Cavernosal connective tissue density was increased while the sinusoidal spaces were diminished in untreated SHR. All treatments were effective in maintaining connective tissue density in comparison to normotensive animals. Cavernosal smooth muscle density was similar in all groups, with the exception of the combination therapy group, which demonstrated a reduction in smooth muscle. Hypertension promoted structural alterations in the corpus cavernosum that may be related to ED. Enalapril and sildenafil treated animals had preservation of normal corpus cavernosum structure and an increase in penile and cavernosal cross-sectional area. The combination of these drugs showed less benefit than individual use.

**Keywords:** Erectile dysfunction. Hypertension. Morphology. Penis. Enalapril. Sildenafil. Rato

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fluxograma do sistema renina angiotensina aldosterona e a atuação do inibidor da enzima conversora de angiotensina .....	17
Figura 2 –	Divisão anatômica do pênis do rato .....	19
Figura 3 –	Fotomicrografia do corte transversal do terço médio do pênis de rato ....	19
Figura 4 –	Fotomicrografia do corpo cavernoso do pênis do rato SHR, com 160 dias de vida, mostrando suas principais estruturas .....	21
Figura 5 –	Procedimento de gavagem .....	24
Figura 6 –	Aferição da pressão arterial por pleismografia .....	25
Figura 7 –	Fotomicrografia da régua milimetrada, objetiva de 2x .....	27
Figura 8 –	Utilização da régua milimetrada, objetiva de 2x, para calibrar o software <i>Image J</i> .....	29
Figura 9 –	Utilizando o resultado em pixel para calibrar o software <i>Image J</i> .....	30
Figura 10 –	Configurando o software <i>Image J</i> .....	31
Figura 11 –	Mensurando a área do corte transversal do terço médio do pênis .....	33
Figura 12 –	Mensurando a área do corte transversal do terço médio do corpo cavernoso com a túnica albugínea .....	34
Figura 13 –	Mensurando a área do corte transversal do terço médio do corpo cavernoso sem a túnica albugínea .....	35
Figura 14 –	Passos para a obtenção do resultado da área da imagem para realização do método de contagem de pontos no software <i>Image J</i> .....	37
Figura 15 –	Configuração para sobreposição da grade de 99 pontos no software <i>Image J</i> .....	38
Figura 16 –	Recurso <i>cell conter</i> para quantificação no software <i>Image J</i> .....	39
Figura 17 –	Apresentação do resultado pela ferramenta <i>cell conter</i> , método de contagem de pontos no software <i>Image J</i> .....	40
Figura 18 –	Fotomicrografia da régua milimetrada utilizada para calibrar o software <i>image J</i> objetiva de 60x .....	41
Figura 19 –	Utilização da régua milimetrada, objetiva de 60x, para calibrar o software <i>Image J</i> .....	42

Figura 20 – Mensuração da área da imagem, após calibração, para expressar o resultado em células por área, <i>software Image J</i> .....	43
Figura 21 – Utilização do recurso <i>cell conter</i> para quantificar o número de células no <i>software Image J</i> .....	44
Figura 22 – Apresentação do resultado pela ferramenta <i>cell conter</i> para o número de densidade de células, no <i>software Image J</i> .....	45
Figura 23 – Gráficos da pressão arterial inicial e final .....	46
Figura 24 - Gráfico da área do corte transversal do pênis ( $\text{mm}^2$ ) .....	48
Figura 25 – Gráfico da área do corte transversal do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea .....	49
Figura 26 – Gráfico da área do corte transversal da túnica albugínea .....	50
Figura 27 – Gráfico da densidade do espaço sinusoidal no corpo cavernoso .....	51
Figura 28 – Gráfico da densidade de tecido conjuntivo no corpo cavernoso .....	52
Figura 29 – Gráfico da densidade de músculo liso no corpo cavernoso .....	52
Figura 30 - Gráfico da densidade de células em proliferação no corpo cavernoso ....	53
Figura 31 – Imagem comparando a estrutura dos corpos cavernosos dos pênis de ratos normotensos e hipertensos com e sem tratamento .....	55
Figura 32 - Imagem comparando a estrutura dos corpos cavernosos dos pênis de ratos normotensos, hipertensos com e sem tratamento .....	56

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 –	Medidas de pressão arterial a partir de 120 dias de idade (início do tratamento) e 160 dias de idade (conclusão do tratamento). Dados dos ratos normotensos (WKY), ratos hipertensos não tratados (H) e ratos hipertensos tratados com enalapril (HE), sildenafil (HS), ou da combinação de enalapril e sildenafil (HES) .....	47
Tabela 2 –	Dados morfométricos penianos dos ratos normotensos (WKY), ratos hipertensos não tratados (H) e ratos hipertensos tratados com enalapril (HE), sildenafil (HS), ou da combinação de enalapril e sildenafil (HES) ...	54

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BSA	Soro de Albumina Bovina
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DAB	Diaminobenzidina
DE	Disfunção Erétil
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclica
H	Hipertenso
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HE	Hipertenso Tratado com Enalapril
HES	Hipertenso tratado com Enalapril e Sildenafil
HS	Hipertenso Tratado com Sildenafil
IECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
ml	Mililitro
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCNA	Antígeno de Proliferação Nuclear Celular
PDE5	Fosfodiesterase Tipo Cinco
SHR	Rato Espontaneamente Hipertenso
SV	Densidade de Superfície
TGF $\beta$ 1	Fator Tranformador de Crescimento Beta1
TRIS-EDTA	Tampão Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
WKY	Wistar Kyoto

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\beta$	Beta
$\times$	Multiplicação
Na	Sódio
$H_2O$	Molécula da água
mmHg	Milímetro de Mercúrio
n	Número
=	Igual
$\pm$	Mais ou menos
$^{\circ}C$	Graus Celsius
mg/kg/dia	Miligramma por quilo por dia
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
$\mu m$	Micrômetro
$H_2O_2$	Peróxido de Hidrogênio
pH	Potencial de hidrogênio
h	Hora
mm	Milímetro
$mm^2$	Milímetro quadrado
$dm^2$	Decímetro quadrado
cm	Centímetro

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	15
1	<b>OBJETIVO .....</b>	22
1.1	<b>Objetivo geral .....</b>	22
1.2	<b>Objetivo específico .....</b>	22
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	23
2.1	<b>Modelo experimental .....</b>	23
2.2	<b>Aferição da pressão arterial .....</b>	24
2.3	<b>Eutanásia e procedimentos histológicos .....</b>	25
2.3.1	<b>Procedimentos histológicos .....</b>	25
2.3.2	<b>Imunohistoquímica .....</b>	26
2.4	<b>Morfometria .....</b>	26
2.4.1	<b>Área do pênis, área do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea e área da túnica albugínea .....</b>	27
2.4.1.1	<b>Calibrando o software image J .....</b>	28
2.4.1.2	<b>Análise das áreas dos cortes transversais .....</b>	32
2.4.1.3	<b>Análise da túnica albugínea .....</b>	32
2.4.2	<b>Densidades de superfície (Sv).....</b>	36
2.4.2.1	<b>Método de contagem de pontos .....</b>	36
2.4.3	<b>Densidade de proliferação celular.....</b>	41
2.5	<b>Análise estatística .....</b>	45
3	<b>RESULTADOS .....</b>	46
3.1	<b>Pressão arterial .....</b>	46
3.2	<b>Área do corte transversal do pênis .....</b>	49
3.3	<b>Área do corte transversal do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea .....</b>	49
3.4	<b>Área do corte transversal da túnica albugínea .....</b>	49
3.5	<b>Densidade espaço sinusoidal no corpo cavernoso .....</b>	50
3.6	<b>Densidade de tecido conjuntivo no corpo cavernoso .....</b>	51
3.7	<b>Densidade do músculo liso do corpo cavernoso .....</b>	52
3.8	<b>Densidade de células em proliferação por área .....</b>	53

4	<b>DISCUSSÃO .....</b>	57
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	61
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	62
	<b>APÊNDICE _ Artigos publicados .....</b>	67
	<b>ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética .....</b>	120

## INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada um problema de saúde pública por sua magnitude, risco e dificuldades no seu controle (1). Na maioria dos casos, essa doença é idiopática, porém, vários são os fatores que podem estar associados à elevação da pressão arterial, entre eles citamos o sedentarismo, estresse, tabagismo, envelhecimento, história familiar, raça, gênero, obesidade e fatores dietéticos (1).

Estima-se que a HAS atinja aproximadamente 22% da população brasileira acima de vinte anos, estando associado por 80% dos casos de acidentes vasculares cerebrais, 60% dos casos de infarto agudo do miocárdio e 40% das aposentadorias precoces, significando um custo de 475 milhões de reais para o governo brasileiro, com números recordes de mais de 1 milhão de internações por ano (2).

A disfunção erétil (DE) foi definida como a incapacidade persistente para alcançar ou manter a rigidez peniana o suficiente para a satisfação sexual (3). Esta é a queixa sexual mais comum que homens apresentam a seus médicos, com prevalência mundial entre 10 e 20% e causa grande impacto na qualidade de vida dos homens e seus parceiros (4). Entre os fatores de risco mais conhecidos para disfunção erétil estão a HAS, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, tabagismo e obesidade, os quais estão relacionados à idade (5). Danos à morfologia peniana podem ser a causa ou a consequência de DE (6). Entre estes danos destaca-se a fibrose do tecido erétil, que é caracterizada pelo aumento de colágeno nos corpos cavernosos. O fator transformante de crescimento beta 1 (TGF  $\beta$ 1), que estimula a síntese de colágeno tem um papel de destaque neste processo. A fibrose no tecido peniano provoca alterações tanto morfológicas como fisiológicas que estão relacionadas com a DE (7).

A DE afeta 68% dos homens hipertensos. Normalmente a DE está associada com a severidade e a duração da HAS (8-10). Em ambas as doenças, fatores endoteliais estão envolvidos, resultando em aumento da contração do músculo liso, que leva ao aumento da pressão vascular, perfusão inadequada no corpo cavernoso e intumescência inadequada (11).

As relações entre doenças cardiovasculares e o trato urogenital não se restringem à HAS e DE. Outras afecções cardiovasculares e o próprio tratamento destas, têm sido relacionadas com diversas doenças no trato urogenital, como a hiperplasia prostática benigna, câncer de próstata, doenças renais e sintomas do trato urinário inferior (12-17).

Existem diversas classes de medicamentos para o tratamento da HAS e algumas dessas classes ocasionam algum prejuízo à ereção (19). No entanto, a evidência sugere que apenas

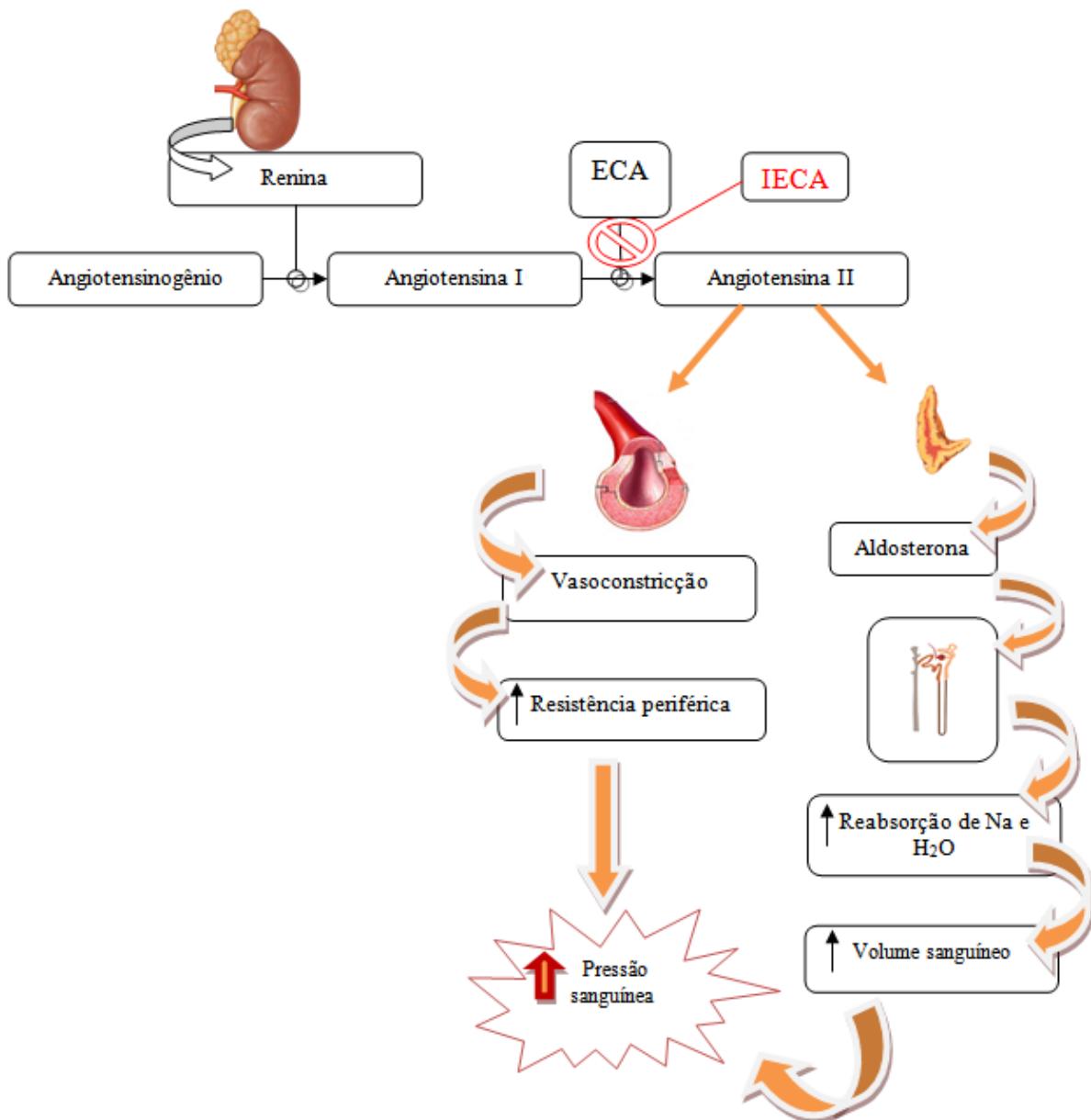
alguns diuréticos e beta-bloqueadores podem influenciar negativamente a função erétil. A enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores dos receptores da angiotensina e bloqueadores dos canais de cálcio têm sido relatados como classes de medicamentos que não trazem efeitos negativos, podendo, eventualmente, ter efeitos positivos sobre a função erétil (19).

O Enalapril é um inibidor da ECA, uma enzima presente em todos os tecidos e fluidos corporais dos mamíferos. A ECA é responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II, com efeito vasoconstritor sistêmico, sendo o maior efetor do sistema renina angiotensina (20, 21) (Figura 1). Alguns estudos mostram que inibidores de ECA não prejudicam a função erétil em ratos (14), e podem melhorar a função sexual em seres humanos (22).

A ereção peniana ocorre quando a musculatura lisa cavernosa relaxa, com aumento do influxo sanguíneo para os seios cavernosos sob a força motriz da pressão arterial. Quando os seios cavernosos se enchem de sangue, ativa-se o mecanismo veno-occlusivo peniano, limitando a saída de sangue do pênis. Assim, a combinação do influxo aumentado e diminuição do efluxo sanguíneo, resultam na rigidez dos corpos eréteis necessários para a ereção (9). O relaxamento da musculatura lisa é mediado pela liberação de óxido nítrico nos corpos cavernosos durante estimulação sexual. O óxido nítrico ativa a enzima guanilato ciclase, que aumenta o nível de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) produzindo o relaxamento das células musculares nos corpos eréteis (22). A fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) é a enzima responsável pela degradação do GMPc no corpo cavernoso, e por isso, quando inibida favorece o relaxamento da musculatura cavernosa com consequente ereção (23).

O sildenafil é um tipo de inibidor seletivo da PDE5, que atua no relaxamento do músculo liso arterial e cavernoso através da via do óxido nítrico (23). Esta classe de medicamento é amplamente utilizada como terapia de primeira linha para DE em homens normotensos e hipertensos (23). O sildenafil foi primeiramente estudado para o uso no tratamento da HAS e angina. As primeiras impressões sugeriram que a droga tinha um efeito de curta duração sobre a angina e HAS. Foi observado durante a fase inicial das pesquisas, que o inibidor da PDE5 tinha como efeitos colaterais o rubor facial, dores de cabeça e que induzia fortemente ereções penianas. Consequentemente os pesquisadores passou a observar o uso do medicamento para o tratamento da disfunção erétil. A droga foi aperfeiçoada e patenteada em 1996, e aprovada para uso na disfunção erétil pela Food and Drug Administration (FDA) em 1998, tornando-se o primeiro medicamento por via oral a ser aprovada para o tratamento das disfunções eréteis. (24)

Figura 1 – Fluxograma do sistema renina angiotensina aldosterona e a atuação do inibidor da enzima conversora de angiotensina



**Legenda:** A renina produzida nos rins converte o angiotensinogênio em angiotensina I. A enzima conversora de angiotensina (ECA) converte a angiotensina I em angiotensina II, que estimula a produção de aldosterona pela medula da glândula adrenal. Esta causa o aumento da reabsorção de Na e de H<sub>2</sub>O nos túbulos contorcidos distais do rim, levando ao aumento do volume sanguíneo. Nos vasos sanguíneos, a angiotensina II causa a vasoconstrição, aumentando a resistência periférica. Assim, a angiotensina II leva ao aumento da pressão arterial tanto pela sua ação direta nos vasos sanguíneos quanto por ação indireta mediada pela adrenal. O inibidor da ECA (IECA) atua evitando a conversão da angiotensina I em angiotensina II, consequentemente reduzindo a pressão arterial.

**Fonte:** Marieb, 2009 modificado (25).

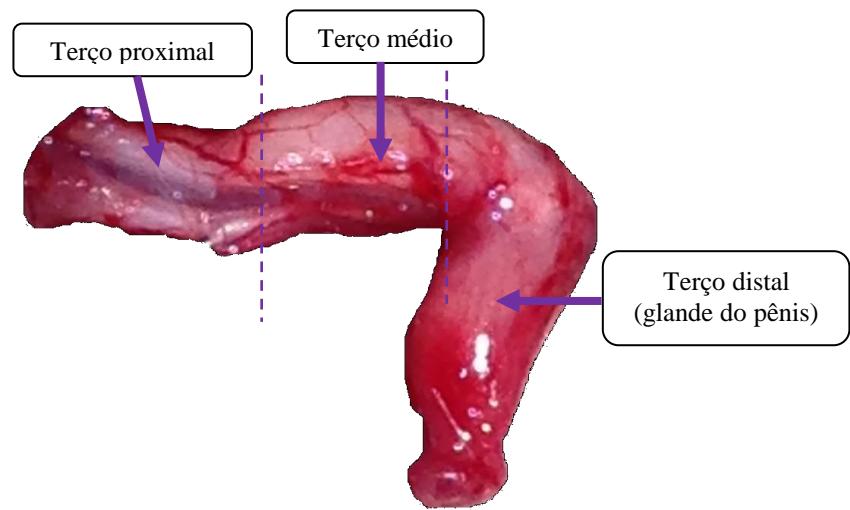
Tendo em vista que os inibidores de PDE5 atuam promovendo o relaxamento da musculatura lisa, foi sugerido que seu uso poderia diminuir a pressão arterial sistêmica, relaxando o músculo liso vascular de modo semelhante à sua ação no músculo liso dos corpos cavernosos. Alguns autores mostraram que o uso diário dos inibidores de PDE5 pode ser benéfico à terapia anti-hipertensiva (26, 27).

Embora a DE seja multifatorial (28), a estrutura do corpo cavernoso desempenha importante papel no mecanismo de ereção (6). Proporções normais destas estruturas são necessárias para desenvolver e manter a ereção, e as proporções alteradas podem estar relacionadas com a DE (6).

Existem vários modelos animais para o estudo da DE. Embora o pênis do rato não seja o mais semelhante ao pênis do homem, diversos estudos utilizam este modelo. Podemos dividir o pênis do rato em três terços: proximal, médio e distal. O terço proximal é a região onde se localiza a crura do pênis, com sua inserção nos ramos do ísquio e púbis, onde os corpos cavernosos estão separados. O terço médio limita-se distalmente pela flexura do pênis que o separa do terço distal (Figura 2). O terço médio do pênis do rato é composto por dois corpos cavernosos, unidos entre si e situados dorsalmente ao corpo esponjoso. Cada estrutura erétil é recoberta por uma túnica fibrosa, denominada túnica albugínea (29) (Figura 3).

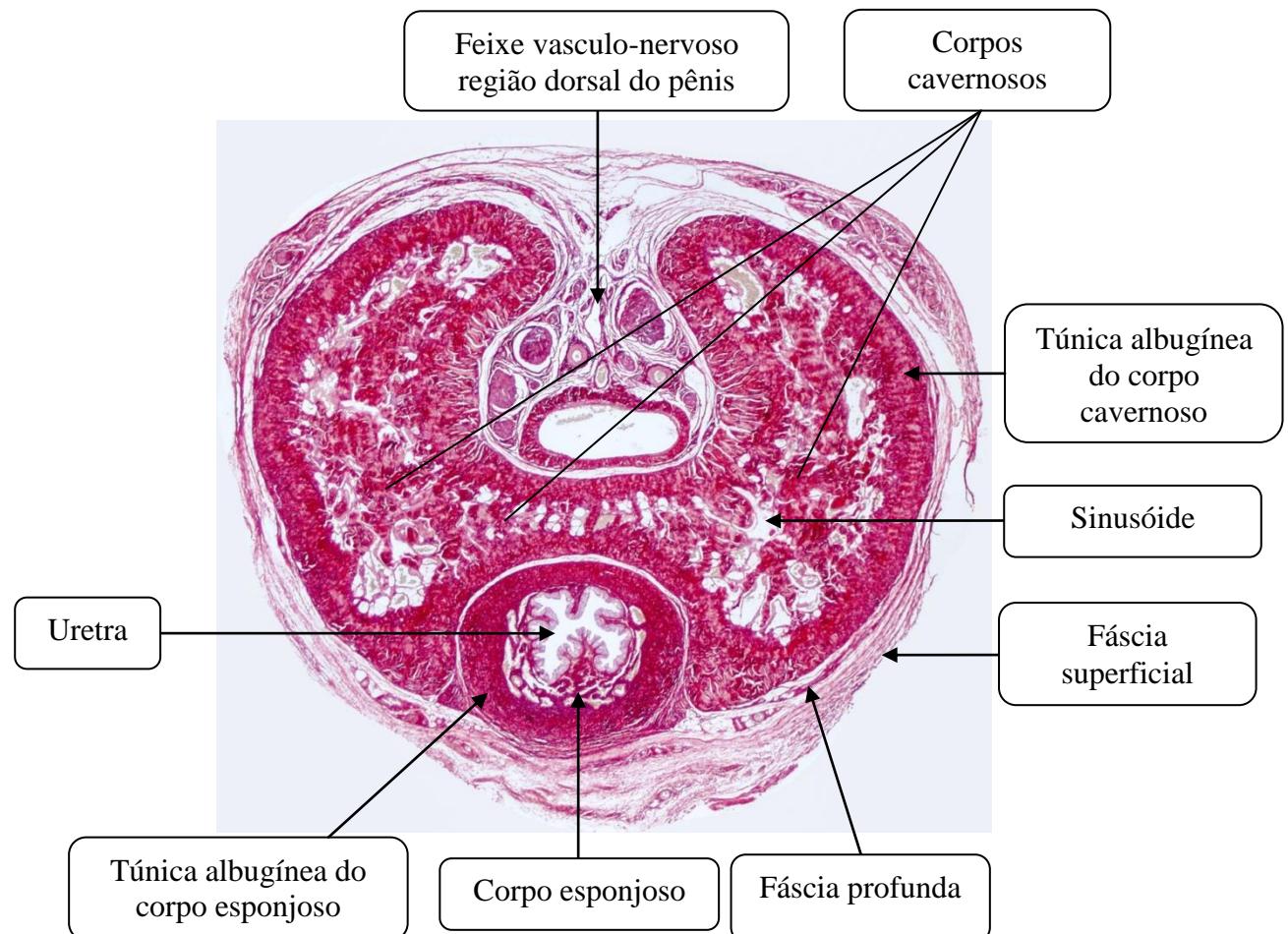
Diferente do pênis humano, os ratos possuem na glande peniana, no terço distal uma estrutura osteocartilagínea. Por esta razão, a região peniana que possui as estruturas mais semelhantes ao pênis humano, embora com organização estrutural diferente, é o terço médio, e, portanto é esta região estudada neste modelo experimental.

Figura 2 – Divisão anatômica do pênis do rato.



Legenda: Imagem do pênis de rato após ser dissecado, com indicações de sua divisão em três porções: proximal, médio e distal (setas). As linhas tracejadas indicam a região aproximada da divisão em terços.

Figura 3 – Fotomicrografia do corte transversal do terço médio do pênis de rato



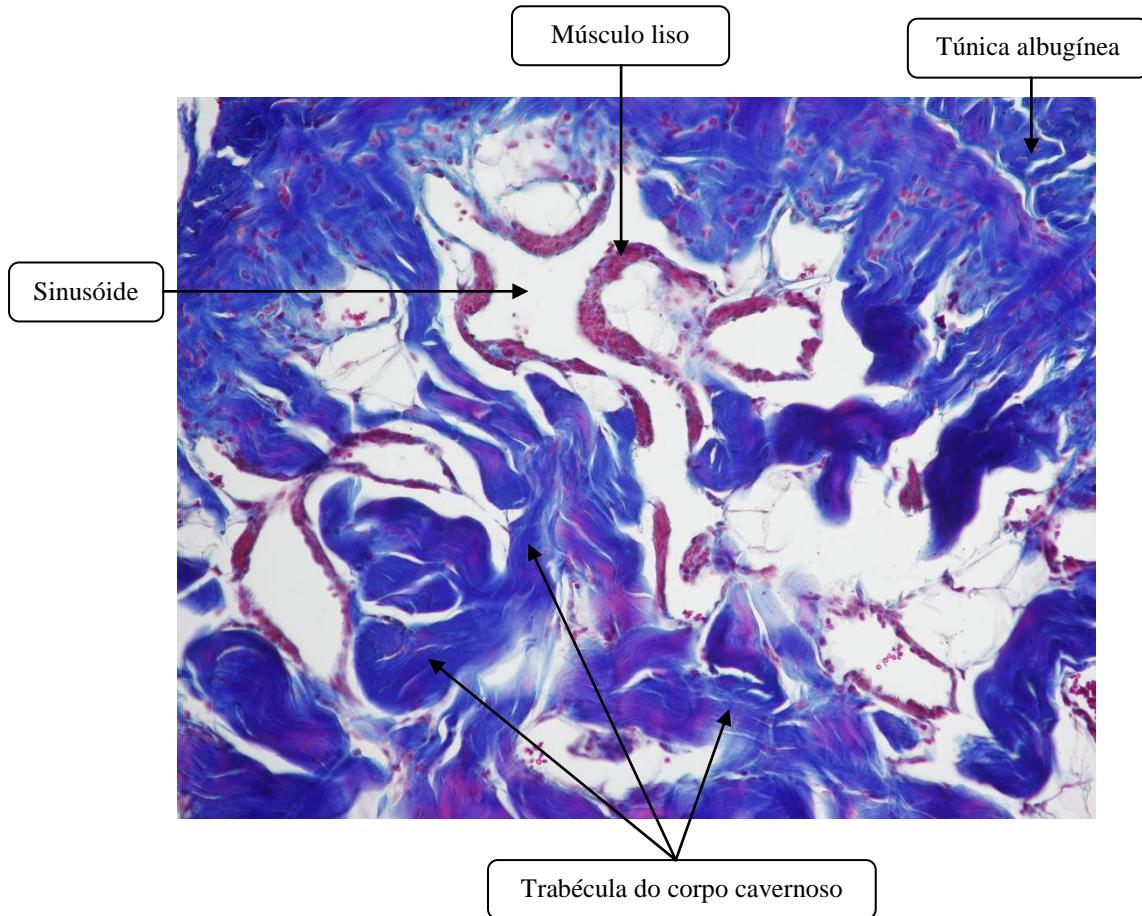
Legenda: Fotomicrografia dos principais componentes no corte transversal do terço médio do pênis de rato corado com vermelho de picrosírius, objetiva de 2x.

As trabéculas dos corpos cavernosos são basicamente formadas por tecido conjuntivo, predominantemente por fibras colágenas, que conferem suporte às células musculares lisas, que por sua vez circundam os espaços sinusoidais. Estes espaços são preenchidos por sangue para a entumescência e rigidez peniana durante a ereção. O músculo liso do pênis do rato localiza-se na região perissinusoidal, enquanto no homem o músculo liso mistura-se ao tecido conjuntivo e elástico para formar as trabéculas do corpo cavernoso (30). O corpo esponjoso, que abriga no seu interior a uretra, também possui sinusóides e trabéculas, porém em proporções menores que as dos corpos cavernosos (30). A túnica albugínea é uma túnica espessa formada basicamente por tecido conjuntivo fibroso e elástico (29) (Figura 4).

A linhagem de rato espontaneamente hipertenso (SHR) foi obtida por endogamia de ratos Wistar Kyoto (WKY) com pressão sanguínea elevada (31). Nestes ratos, a pressão arterial aumenta de forma contínua a partir da quinta até a décima quinta semana de vida, quando se estabiliza em valores superiores a 200 mmHg. Animais SHR apresentam alterações vasculares e, por isso tem sido o principal modelo animal usado para estudar a hipertensão e outras doenças cardiovasculares associadas, incluindo a disfunção erétil (32). O pênis destes animais apresentaram alterações estruturais e ultraestruturais, com aumento de colágeno e modificações da parede vascular (33, 34).

Embora tenha sido mostrado, no modelo SHR, que a morfologia do corpo cavernoso se altera com a HAS, com comprometimento da função erétil destes animais (34-36), não se sabe se estas alterações morfológicas podem ser evitadas ou revertidas com o uso de enalapril, sildenafil, ou com a combinação desses medicamentos. A hipótese deste estudo foi que as alterações morfológicas promovidas pela HAS no corpo cavernoso podem ser amenizadas com o uso de inibidores da ECA e/ou inibidores da PDE5.

Figura 4 – Fotomicrografia do corpo cavernoso do pênis do rato SHR, com 160 dias de vida, mostrando suas principais estruturas



Legenda: Fotomicrografia de parte do corpo cavernoso, mostrando as trabéculas formadas basicamente por tecido conjuntivo (azul) que envolvem os espaços denominados de sinusóides (luz). O músculo liso (vermelho) localizado na região perissinusoidal. Estas estruturas são envolvidas pela túnica fibrosa, também constituída basicamente por tecido conjuntivo, a túnica albugínea (azul). As estruturas estão indicadas por setas acompanhadas de sua nomenclatura.

Nota: Tricrômico de Masson, objetiva de 20x.

## 1 OBJETIVO

### 1.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi verificar se a utilização isolada ou combinada de enalapril e de sildenafil modifica a morfologia do pênis em ratos espontaneamente hipertensos.

### 1.2 Objetivo específico

O objetivo específico foi estudar por meio de métodos histomorfométricos a área total do pênis, a área do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea, a área da túnica albugínea e as densidades de colágeno, de espaço sinusoidal, de músculo liso e a densidade de células em proliferação por área no corpo cavernoso.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

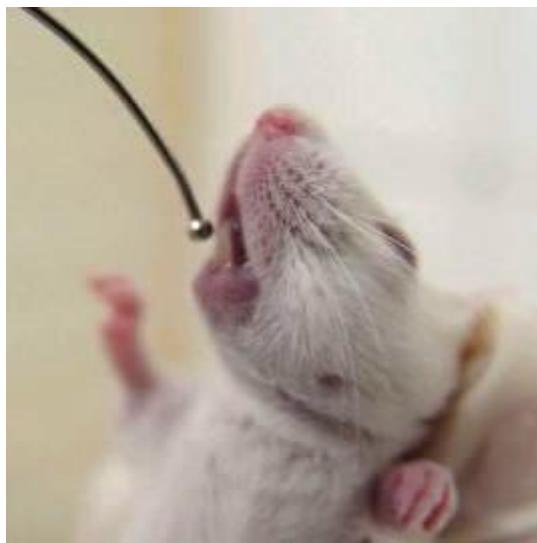
### 2.1 Modelo experimental

Foram utilizados 50 ratos ( $n=40$  SHR e  $n=10$  Wistar Kyoto) machos com 120 dias de vida, mantidos em biotério, com temperatura de  $21\pm1$  °C, submetidos a controle de ciclo de 12h claro/escuro (luz artificial, 7:00 as 19:00 horas), recebendo ração comercial e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados na Unidade de Pesquisa Urogenital em conformidade com as orientações convencionais para a experimentação com animais. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram submetidos e aprovados no Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da Universidade Estadual do Rio de Janeiro com protocolo nºCEUA/051/2012 (ANEXO I).

Os animais foram divididos em cinco grupos, cada um com 10 animais: (1) grupo WKY, composto por ratos normotensos Wistar Kyoto; (2) grupo H, composto de SHR não tratado; (3) grupo HE, composto por SHR tratados com enalapril; (4) grupo HS, composto de animais SHR tratados com sildenafil; e (5) grupo HES, composto por SHR tratados com enalapril e sildenafil.

Todos os animais foram submetidos ao tratamento por via oral durante 40 dias consecutivos a partir de 120 dias de vida. Os grupos HE e HES receberam doses de 30 mg/kg/dia de Enalapril (Primordium Farmácia de Manipulação, Rio de Janeiro, Brasil) (14, 37), e os grupos HS e HES receberam doses de 1 mg/kg/dia de Sildenafil (Primordium Farmácia de Manipulação, Rio de Janeiro, Brasil) (38). As drogas foram diluídas em salina de modo que cada animal recebesse um volume de 2 mL por gavagem, utilizando sonda metálica. Os animais dos grupos WKY e H receberam a mesma dose da solução final com salina, também por gavagem, pelo mesmo período (Figura 5).

Figura 5 – Procedimento de gavagem

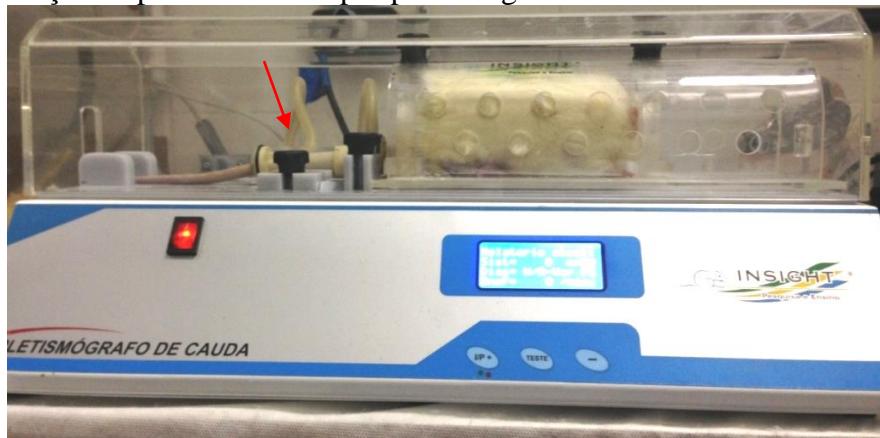


Legenda: A imagem mostra o momento do procedimento da gavagem de salina, por sonda orogástrica, em animal do grupo normoteno (WKY).

## 2.2 Aferição da pressão arterial

A pressão arterial sistólica foi aferida semanalmente, a partir de 90 dias de vida, para que no início da administração dos medicamentos (120 dias de vida) os animais já estivessem adaptados ao procedimento. Semanalmente durante todo o experimento, a pressão arterial foi aferida por pleismografia da artéria caudal (Pleismógrafo, Insight, São Paulo, Brasil) (Figura 6). As aferições foram realizadas sempre no mesmo horário (entre 16 e 18 horas) e todos os animais foram mantidos aquecidos em caixa de acrílica por 10 minutos para dilatar a artéria caudal anteriormente a cada aferição. A média de três aferições da pressão arterial sistólica foi registrada em mmHg e usada para confirmar o modelo de hipertensão arterial sistêmica e os efeitos dos medicamentos sobre este parâmetro.

Figura 6 – Aferição da pressão arterial por pletismografia



Legenda: A imagem mostra a aferição da pressão arterial no animal do grupo WKY, 130 dias de vida, por pletismografia da artéria caudal. O animal posicionado no contensor com a calda no *cuff* (seta vermelha) do pletismógrafo.

## 2.3 Eutanásia e procedimentos histológicos

Os animais de todos os grupos foram mortos ao completar 160 dias de vida, por sobredose anestésica de tiopental sódico (Cristália, São Paulo, Brasil). Os pênis foram retirados, dissecados e o terço médio do pênis foi separado para a realização dos procedimentos histológicos.

### 2.3.1 Procedimentos histológicos

As amostras do terço médio do pênis dos ratos foram lavadas em solução salina (0,9% NaCl) e fixadas por imersão em formaldeído a 3,7% em tampão fosfato salino (PBS) por um período mínimo de 24 horas.

O material foi submetido às técnicas histológicas de rotina, desidratado em álcool e clarificado em xanol para posterior inclusão em parafina. Após a inclusão, foram realizados cortes histológicos com 5 µm de espessura, corados pela hematoxilina & eosina para verificar a integridade dos tecidos, pelo vermelho de picrosírus e pelo tricrômico de Masson. Os cortes corados pelo vermelho de picrosírus foram utilizados para mensurar as áreas do pênis, corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea e a área da túnica albugínea. Os cortes corados pelo

tricrômico de Masson foram utilizados para quantificar o tecido conjuntivo, músculo liso e o espaço sinusoidal.

### 2.3.2 Imunohistoquímica

A imunomarcação foi realizada com o anticorpo primário policlonal anti-antígeno de proliferação nuclear celular (PCNA, o código de produto 13-3900, Invitrogen, Camarillo, EUA). Lâminas histológicas silanizadas, com cortes desparafinados hidratados e tratados com tampão ácido etilenodiamino tetra-acético (TRIS-EDTA), pH 9,0, *overnight* a 60°C por 12h para a recuperação de antígenos, e em seguida, tratada com solução de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 3% em metanol durante 10 minutos para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Estes passos foram seguidos por lavagem dos cortes em tampão fosfato salino (PBS) e subsequentemente incubado à temperatura ambiente com 10% de soro de cabra para bloquear a ligação inespecífica. Os cortes foram então incubados *overnight* a 4 ° C com o anticorpo primário anti-PCNA diluído em PBS com 1% de soro de albumina bovina (BSA), 1: 100. Os cortes foram lavados em PBS e incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos com anticorpo secundário específico (Zymed Laboratories, Inc., São Francisco, Califórnia, EUA). Após este processo, os cortes foram lavados em PBS, tratadas com líquido de diaminobenzidina (DAB) (Zymed Laboratories), e em seguida, contrastadas com hematoxilina. As lâminas de controle negativo foram processadas através da substituição do anticorpo primário por PBS e não se observou qualquer indicação de marcação.

## 2.4 Morfometria

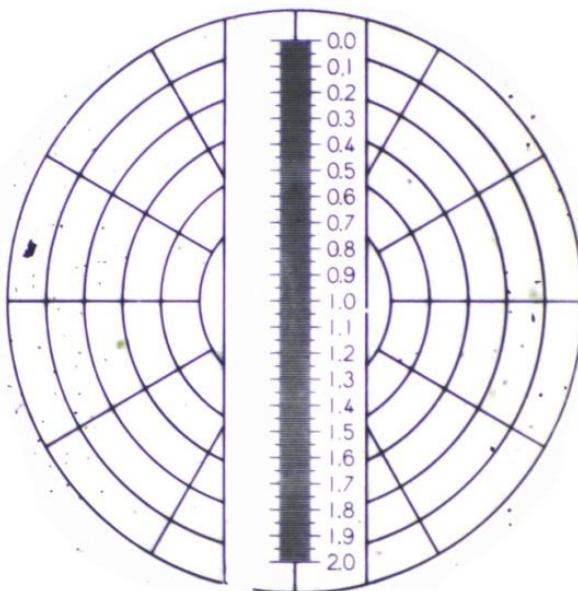
Embora descrições de alterações morfológicas sejam válidas em algumas circunstâncias específicas, para a maioria das situações, os resultados científicos ganham valor quando expressos numericamente (39, 40). É com base nesta premissa que o uso de morfometria para a pesquisa médica se sustenta. A quantificação de uma estrutura, macroscópica ou microscópica, gera precisão e dá credibilidade ao estudo, gerando dados numéricos que podem ser utilizados para comparações estatísticas (41, 42).

Todas as nossas análises morfológicas foram realizadas através de fotomicrografias capturadas com câmera digital Olympus (DP70, Tókio, Japão) acoplada no microscópio (OLYMPUS BX51, Tókio, Japão). Para cada análise, as fotomicrografias foram capturadas e salvas sob as mesmas condições.

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

Para as análises morfométricas das áreas do pênis foram utilizadas fotomicrografias das lâminas coradas pelo vermelho de picrosirius, capturadas em campo claro, com aumento de 20x. Nestas imagens foi possível observar todo o corte transversal do pênis. As áreas do corte transversal do pênis, do corpo cavernoso com e sem sua túnica albugínea foram mensuradas em  $\text{mm}^2$ . Estas mensurações foram realizadas no software *Image J* (versão 1.45s, Instituto Nacional de Saúde, EUA) com a ferramenta “*free Hand*”. Para apresentação dos dados em  $\text{mm}^2$  foi necessário realizar, previamente as mensurações, calibrar o software com a fotomicrografia da lâmina histológica com a régua milimetrada (Figura 7).

Figura. 7 – Fotomicrografia da régua milimetrada, objetiva de 2x



Legenda: Fotomicrografia da régua milimetrada utilizada para calibrar o software *Image J*, necessária para que o software forneça resultados em milímetros. Com o auxílio da régua, podemos converter os valores em pixels para qualquer unidade métrica.

Nota: Régua milimetrada, objetiva de 2x.

#### 2.4.1.1 Calibrando o *software image J*

Para obtenção dos dados em  $\text{mm}^2$  é necessário calibrar o software, pois a unidade em que qualquer software de imagem se baseia é o pixel. Para que o *Image J* nos forneça os dados em  $\text{mm}^2$ , realizamos os seguintes passos de calibração:

Passo 1 - Abrimos a fotomicrografia da régua milimetrada no *Image J*;

Passo 2 - Selecionamos a ferramenta “*Straight line selections*” (linha reta) e na imagem selecionamos uma distância (comprimento) conhecida na régua (0,0 a 0,5), como o demonstrado na Figura 8 A. Para objetivas de aumento pequeno, como a utilizada (objetiva de 2x), quanto maior a distância marcada na régua, menor será o erro de marcação e maior a acurácia. Para realizar uma marcação correta é necessário que a linha esteja em ângulo reto, para isso, basta ao selecionar o comprimento pressionar o botão *shift* do teclado;

Passo 3 – Clicamos em *analyze*, e depois *measure* (Figura 8 B). Observamos na janela *results*, o resultado da distância marcada, ou seja, o comprimento (*length*) em pixels, referente a quantos pixels equivalem ao comprimento da linha reta traçada anteriormente na distância de 0,0 a 0,5 mm (Figura 9 A).

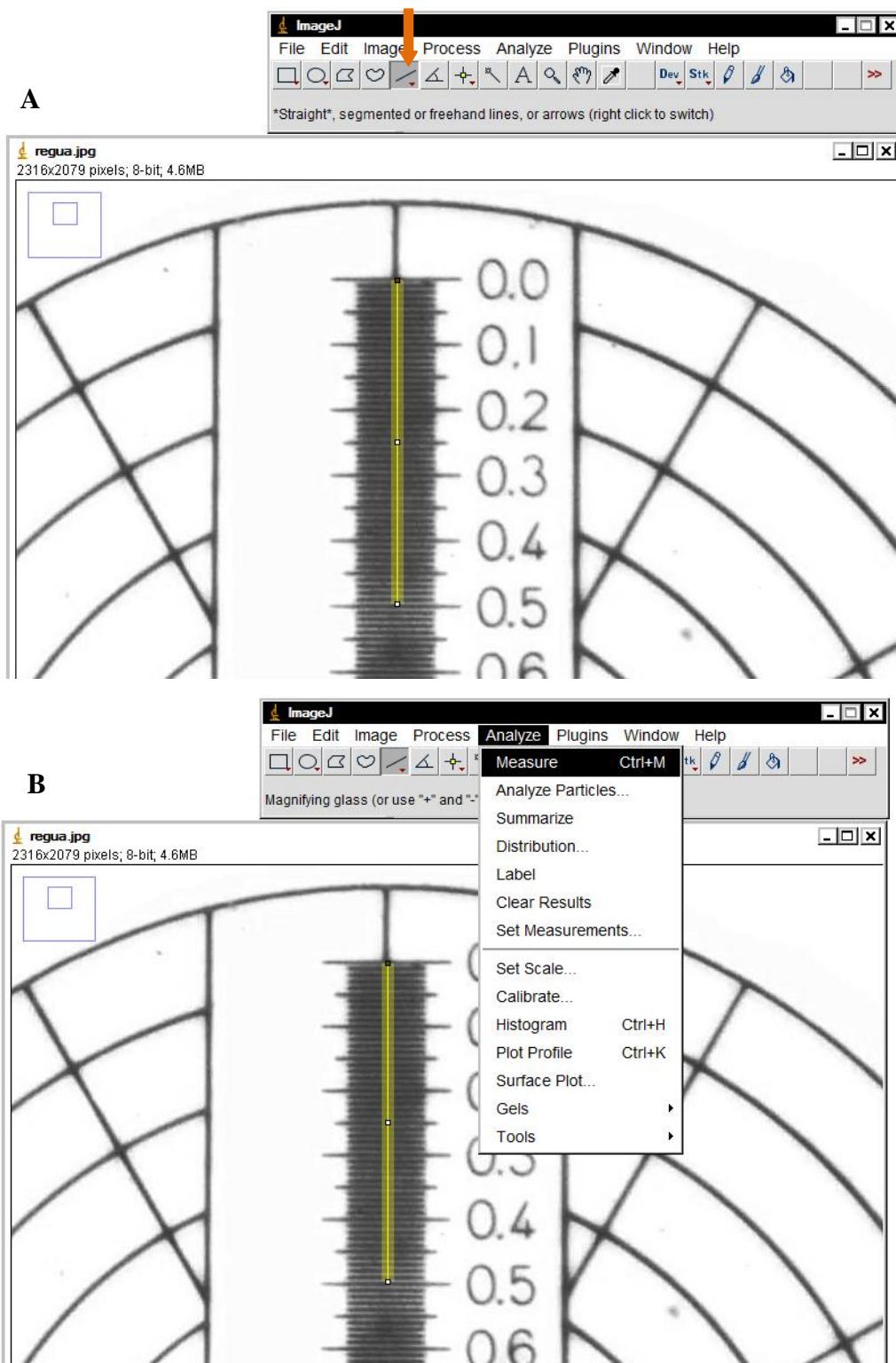
O software nos fornece a distância em pixels, e nós informamos ao software que aquela distância (comprimento) corresponde 0,5 mm, como citado no passo 2.

Passo 4 – Clicamos em *analyze*, e depois *set scale* (Figura 9 B). Na janela *set scale* que se abrirá, o software já nos fornece o comprimento que foi marcado pela linha reta, em pixel, *distance in pixels* (286). Preenchemos então a distância conhecida, *known distance*, que representa o valor numérico do comprimento da reta selecionado na régua (0,5), colocamos a unidade de medida (mm), *unit of length*, selecionamos o *box global* e clicamos na opção *ok* (Figuras 10 A).

Ao marcarmos a opção do *box global*, qualquer mensuração realizada no software, enquanto estiver aberto, estará em mm. Para certificarmos nossa calibração, mensuramos novamente à distância marcada, e o resultado deverá ser 0,5 (Figura 10B).

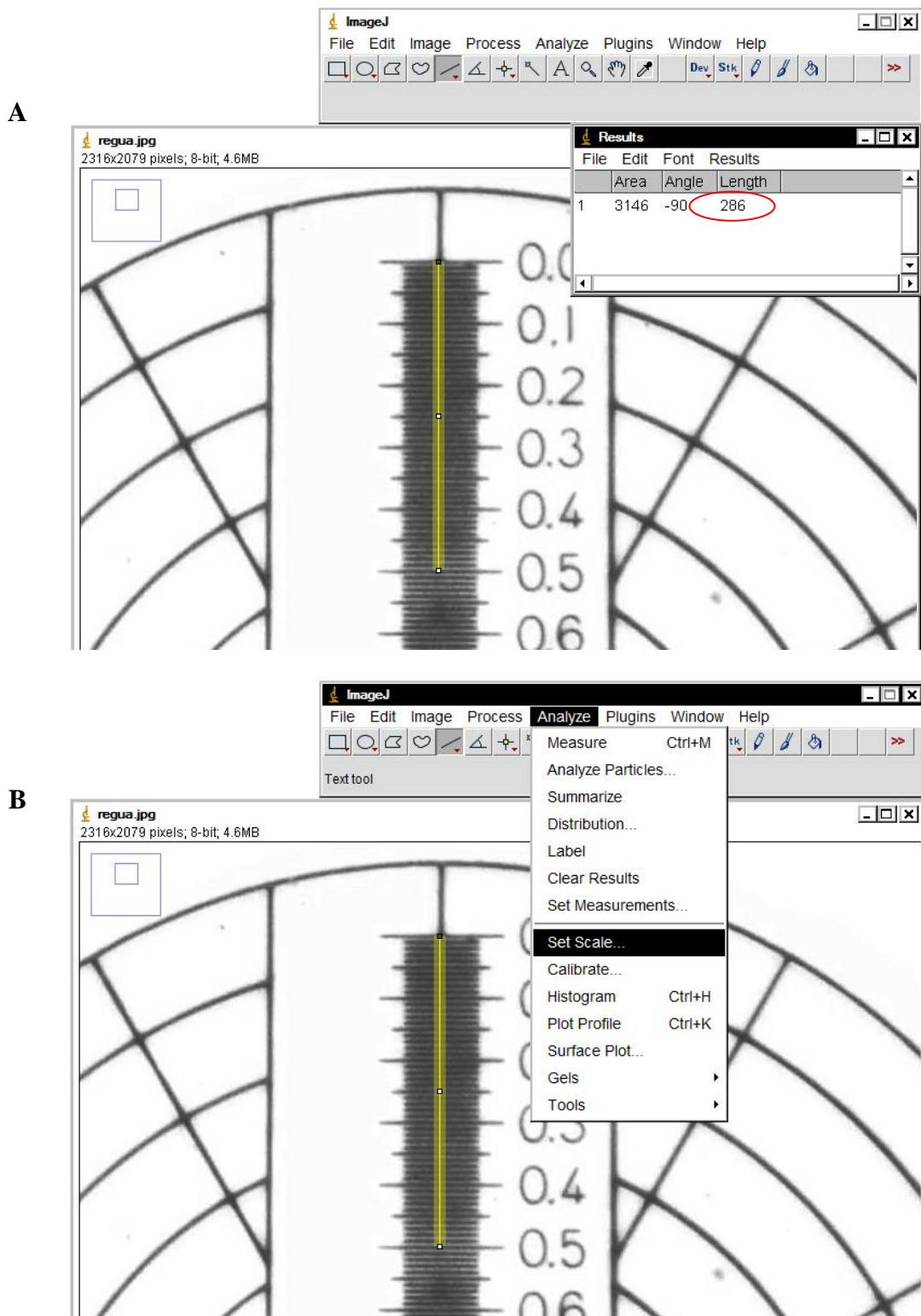
É importante ressaltar que o software está em inglês, portanto, a numeração deve ser preenchida utilizando ponto (.) como separador de casas decimais e não a vírgula. Caso utilize a vírgula verás que a calibração estará errada.

Figura 8 – Utilização da régua milimetrada, objetiva de 2x, para calibrar o software *Image J*



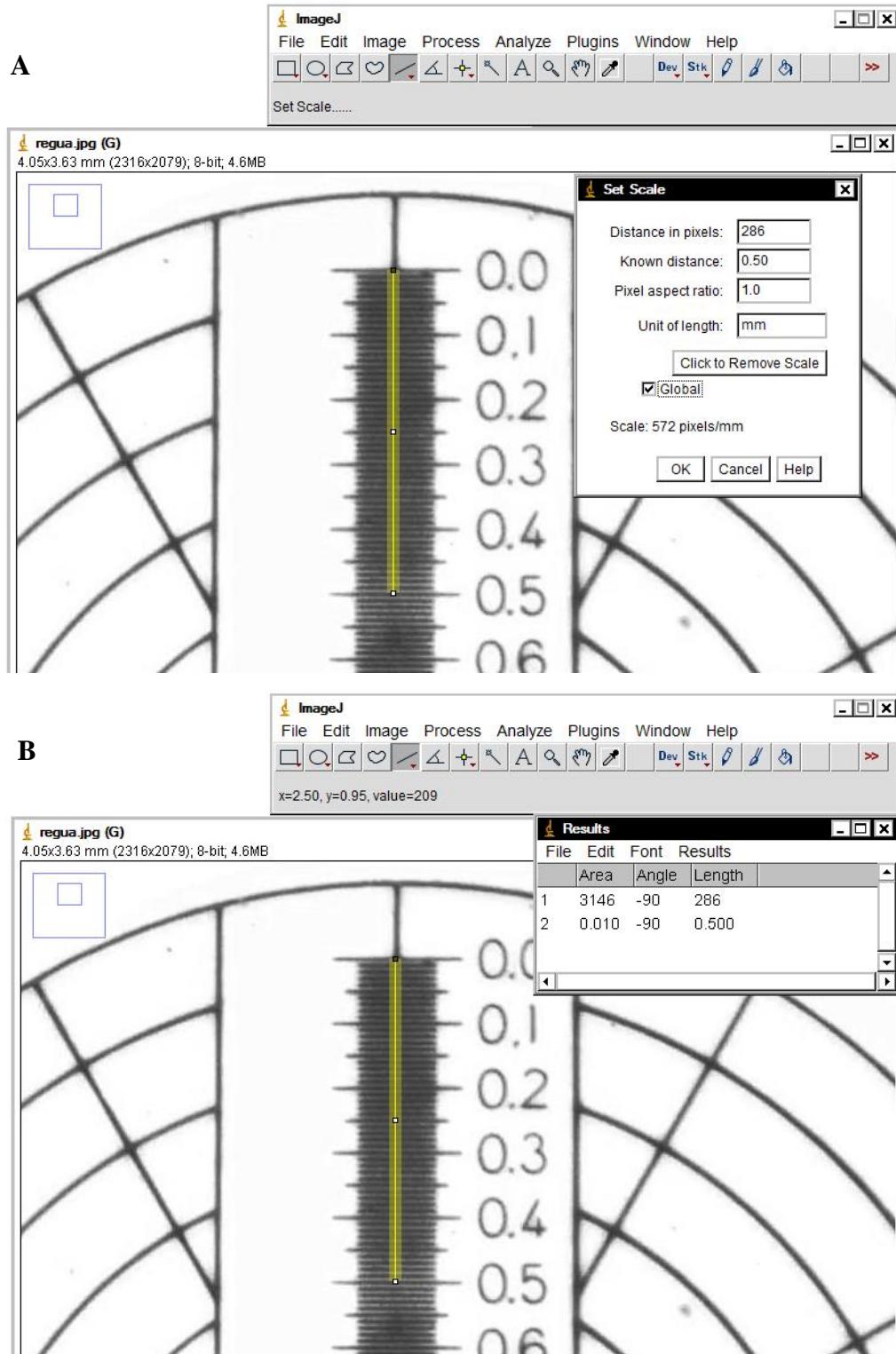
Legenda: Em A, o primeiro passo para calibrar o software em mm com a seleção da distância (comprimento) conhecida na régua (0,0 a 0,5 mm). A seta em laranja indica a ferramenta a ser usada para marcar o comprimento e em amarelo a linha reta, com a distância de 0,5mm, selecionada. Em B, os passos para a mensuração do comprimento em pixels da linha reta, *analyze, measure*.

Figura 9 – Utilizando o resultado em pixel para calibrar o software *Image J*



Legenda: Em A, a janela *results* com o valor em pixels, 286 (circulo vermelho), da linha reta mensurada, marcado na distância (comprimento) de 0,5 mm na fotomicrografia da régua milimetrada. Em B, clicamos na opção *analyze*, e selecionamos a opção *set scale*, para que possamos configurar o software.

Figura 10 – Configurando o software *Image J*



Legenda: Em A, o preenchimento da janela *Set Scale*. Repare que a distância em pixel, *distance in pixels*, é preenchida automaticamente; a distância conhecida, *Known distance*, preenchida com o valor da distância marcada na régua (0,5); a unidade de medida, *unit of length*, em mm; e o box *Global* selecionado. Em B, após clicamos na opção *analyze e measure* (como mostrado na Figura 08 B), abrirá a janela com o resultado do software já calibrado (0,5mm) para o comprimento previamente selecionado.

#### 2.4.1.2 Análise das áreas dos cortes transversais

Para análise das áreas dos cortes transversais do terço médio do pênis, usamos as fotomicrografias das lâminas coradas com o vermelho de picrosírus, sob magnificação de 20x. A ferramenta *free hand* foi utilizada para selecionar as áreas dos cortes transversais que foram envolvidas e mensuradas uma após a outra, primeiro a área do pênis (Figura 11) e em seguida as áreas do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea (Figura 12 e 13).

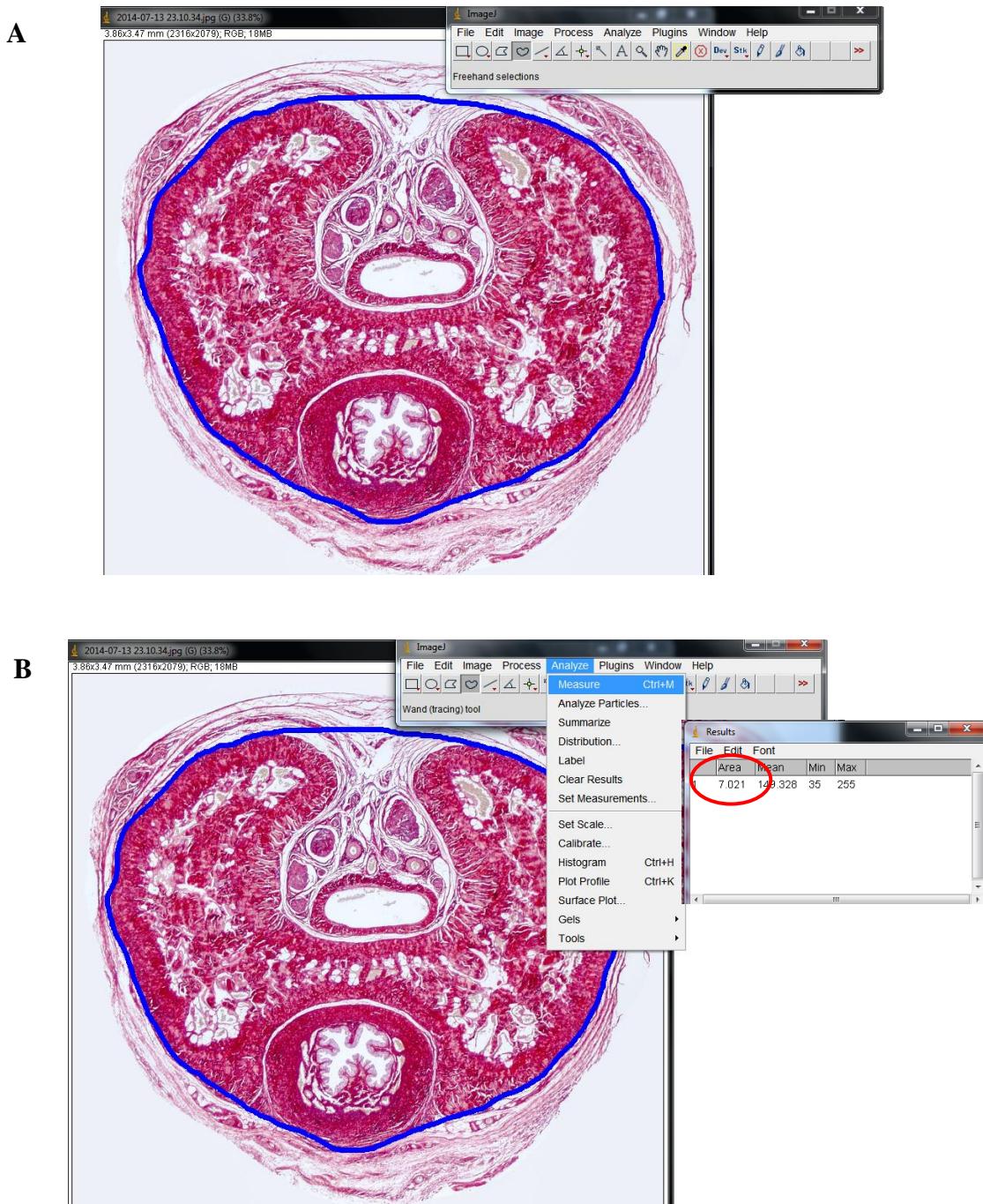
Ao terminar a marcação da área desejada foram selecionadas as opções *analyze*, *measure*. A janela *results* nos forneceu os valores referentes às áreas envolvidas em mm<sup>2</sup>. O mesmo procedimento foi realizado para analisar todas as áreas dos cortes transversais (como ilustrado na Figura 11 B), com a exceção da área do corte transversal da túnica albugínea.

Os resultados numéricos de cada avaliação das áreas foram tabulados em uma planilha para posterior análise.

#### 2.4.1.3 Análise da túnica albugínea

A área da túnica albugínea do corpo cavernoso foi estimada pela subtração da área do corpo cavernoso com e sem sua túnica albugínea. Os resultados foram tabulados em planilha para posterior análise.

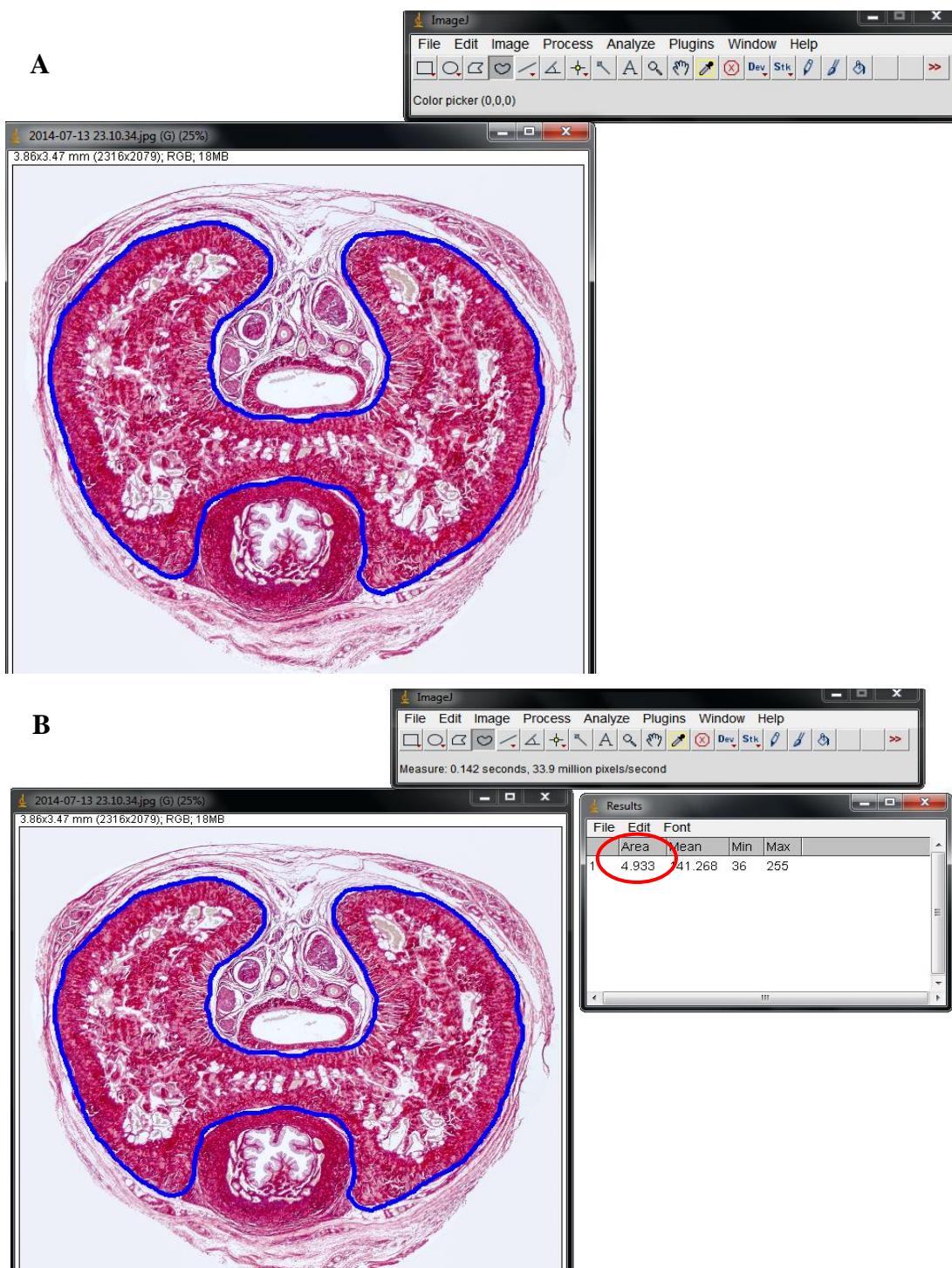
Figura 11 – Mensurando a área do corte transversal do terço médio do pênis



Legenda: Em A, utilizando a ferramenta mão live, *free hand*, envolvemos a área do corte transversal do pênis. Em B, selecionamos a opção *analyze, measure*, que nos fornece o resultado da área selecionada em mm, após calibração.

Nota: Fotomicrografia do pênis do grupo WKY, objetiva de 2x, aberta no software Image J.

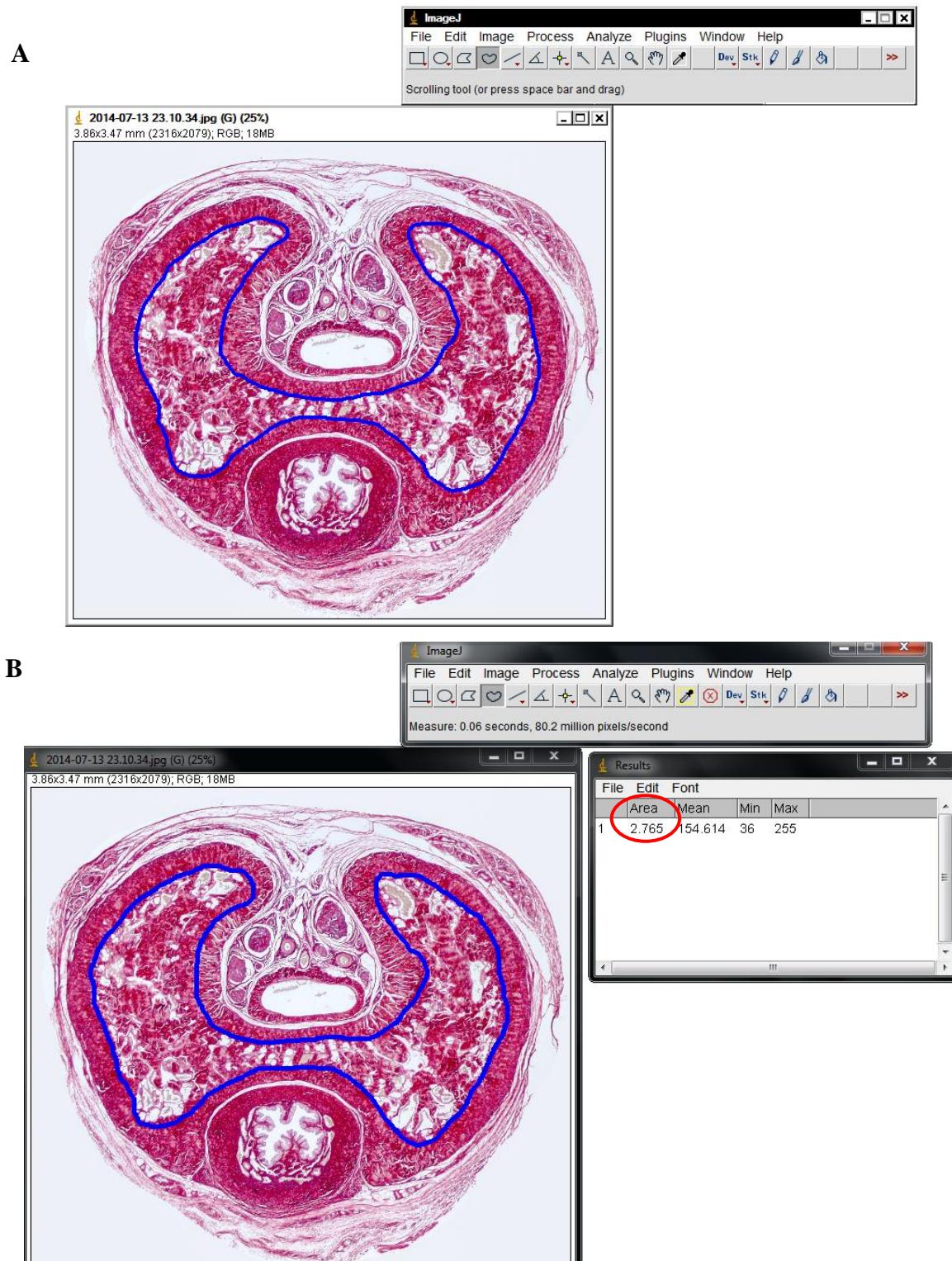
Figura 12 – Mensurando a área do corte transversal do terço médio do corpo cavernoso com a túnica albugínea



Legenda: Em A, utilizando a ferramenta mão live, *free hand*, envolvemos a área do corte transversal do corpo cavernoso com a túnica albugínea. Em B, após selecionar as opções *analyze*, *measure*, a janela *results* nos mostrando o resultado da área selecionada em mm (circulo vermelho, 4.933), com o software calibrado.

Nota: Fotomicrografia do pênis do grupo WKY, objetiva de 2x, aberta no software Image J.

Figura 13 - Mensurando a área do corte transversal do terço médio do corpo cavernoso sem a túnica albugínea



Legenda: Em A, utilizando a ferramenta mão live, *free hand*, envolvemos a área do corte transversal do corpo cavernoso sem a túnica albugínea. Em B, selecionamos a opção *analyze, measure*, que nos fornece o resultado da área selecionada em mm (circulo vermelho, 2.765) após calibração.

Nota: Fotomicrografia do pênis do grupo WKY, objetiva de 2x, aberta no software Image J.

## 2.4.2 Densidades de superfície (Sv)

As densidades de superfície (Sv) do tecido conjuntivo, do espaço sinusoidal, e do músculo liso dos corpos cavernosos foram quantificadas por análise dos cortes corados com tricrômico de Masson. Para cada animal, 25 fotomicrografias do corpo cavernoso foram obtidos com magnificação de 200x. A densidade de cada uma dessas estruturas foi expressa em porcentagem, obtida pelo método de contagem de pontos.

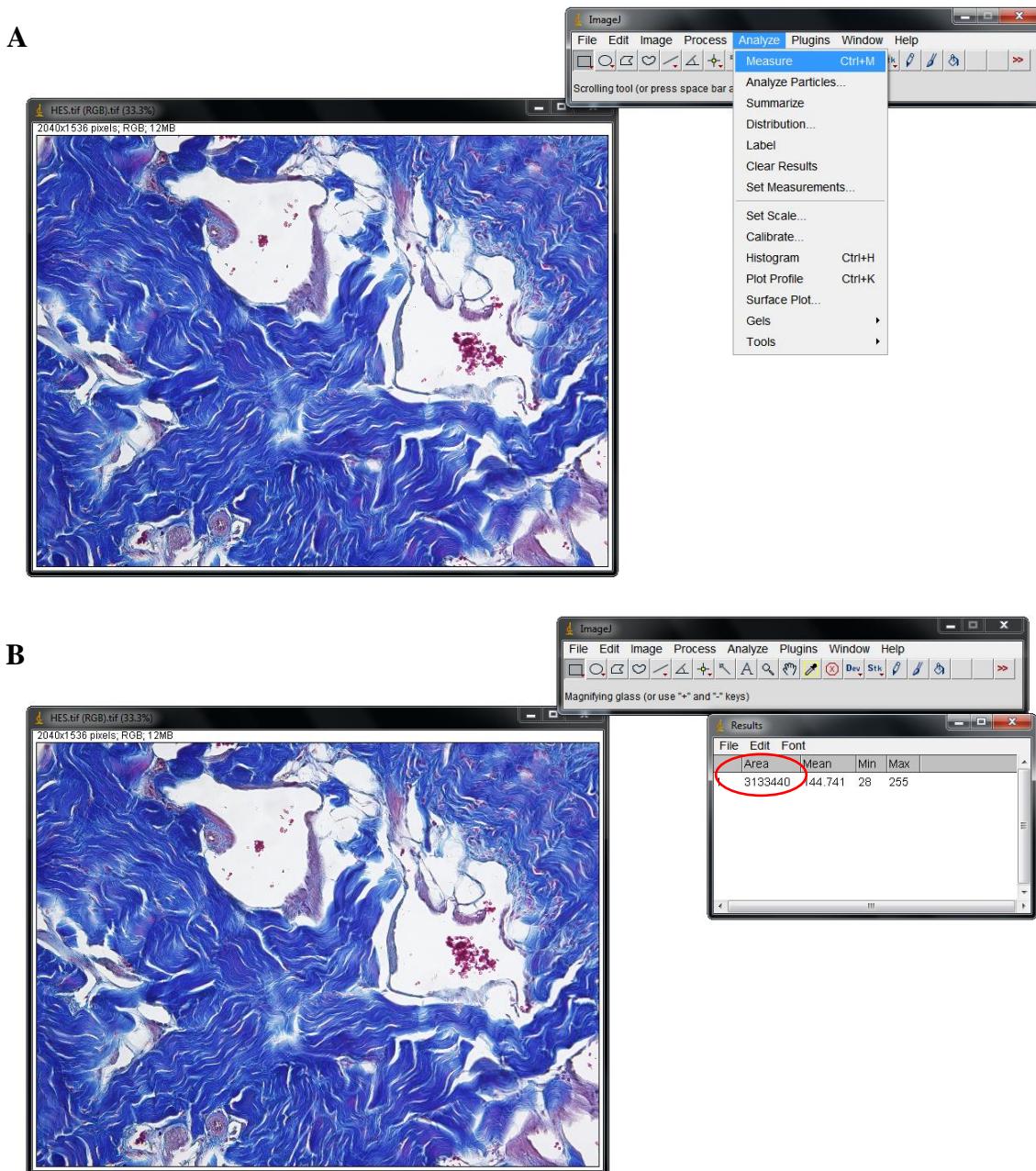
### 2.4.2.1 Método de contagem de pontos

Tradicionalmente, o método de contagem de pontos é usado para obter a densidade de superfície de uma estrutura de interesse. De acordo com este método, o número de pontos que intercepta a estrutura de interesse, dividido pelo número total de pontos sobrepostos para o campo de interesse, representa a densidade da estrutura. O método de contagem de pontos é considerado muito confiável, se suas premissas (randomização, repetição e medições às cegas) forem respeitadas (45, 46, 48-50).

Para este método, uma grade de 99 pontos foi sobreposta às imagens usando a ferramenta *grid* do software *Image J*. O número de pontos que tocavam as estruturas quantificadas, tecido conjuntivo, músculo liso e espaço sinusoidal, foi multiplicado por 100 e dividido por 99 para corrigir a porcentagem para os 99 pontos utilizados como sistema de teste. Desta forma, estes resultados foram considerados como a densidade de superfície de cada uma das estruturas analisadas, expressa em porcentagem.

A ferramenta *cell counter* foi utilizada para quantificar cada uma das estruturas. Esta ferramenta possibilita quantificar mais de uma estrutura na mesma imagem. Para cada estrutura damos um número, apresentado na janela *cell counter*, que deve ser escolhido um para cada estrutura a ser quantificada. Após selecionar o número e iniciar a quantificação, a quantidade de seleções em cada estrutura, que sobrepõem o ponto teste, ficará registrada na janela *cell counter* ao lado do seu número. Os valores encontrados, de cada estrutura em cada imagem, foram tabulados e as médias de cada animal utilizadas para análise estatística. As Figuras 14, 15, 16 e 17 mostram os passos para colocação da grade de 99 pontos no *Image J*.

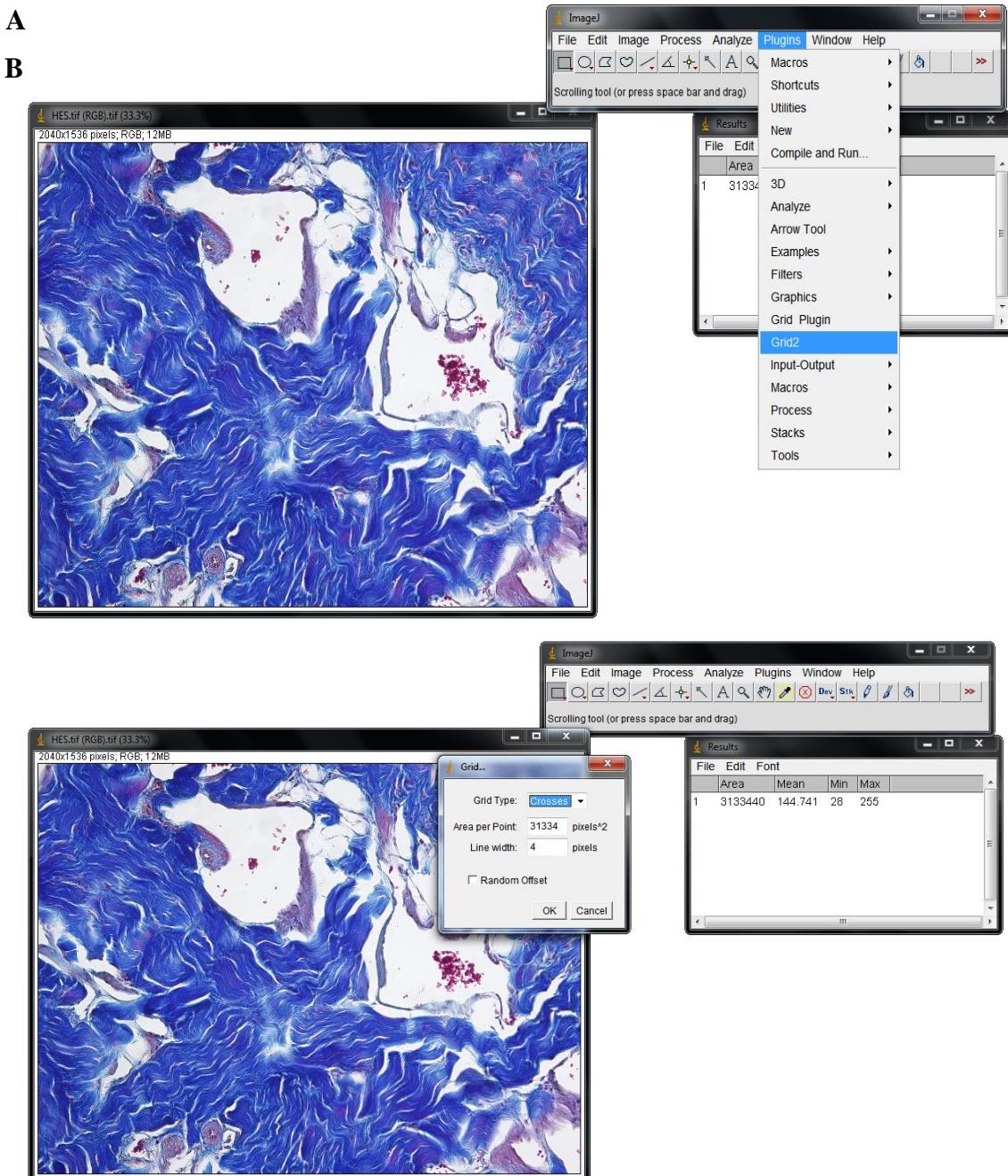
Figura 14 – Passos para a obtenção do resultado da área da imagem para realização do método de contagem de pontos no software Image J



Legenda: Em A, a figura mostra a mensuração da área da imagem, necessária para colocar o sistema teste. Em B, a janela *results* aberta com o resultado da mensuração (circulo vermelho).

Nota: Imagem do corte transversal do terço médio do pênis do rato hipertenso tratado com sildenafil, grupo HES, objetiva de 20x, aberta no software Image J.

Figura 15 – Configuração para sobreposição da grade de 99 pontos no software *Image J*

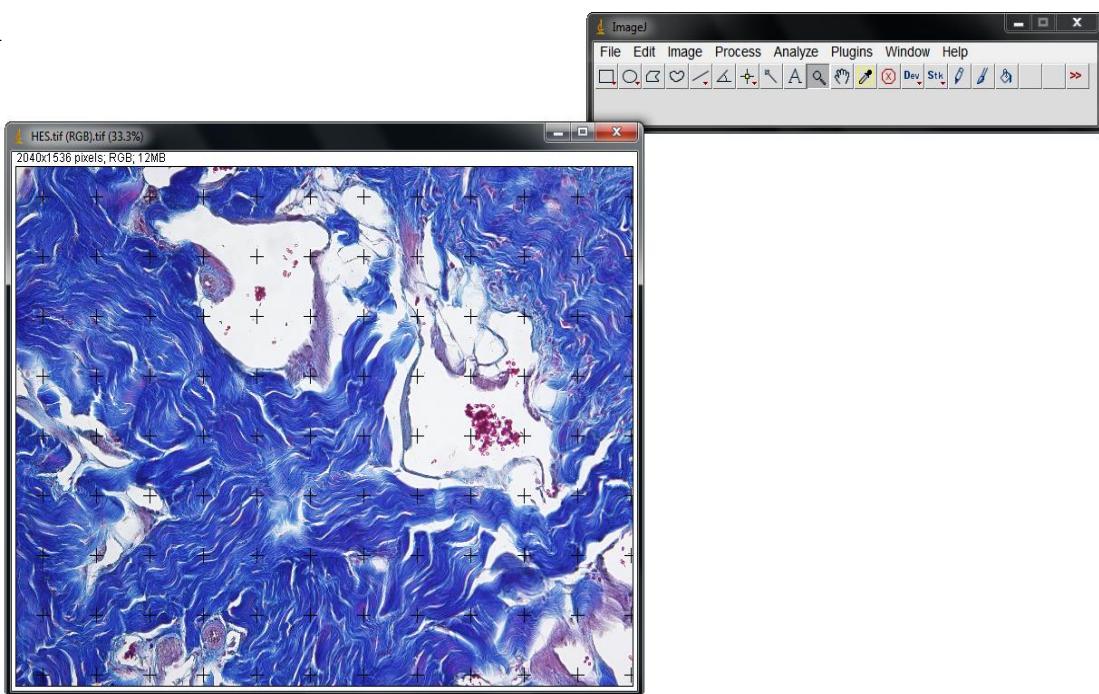


Legenda: Em A, a imagem mostra a seleção da ferramenta *plugins*, *grid2*. Em B, a utilização da área previamente mensurada dividida pelo número de ponto a ser colocado na grade e a seleção do tipo de grade, *crosses*.

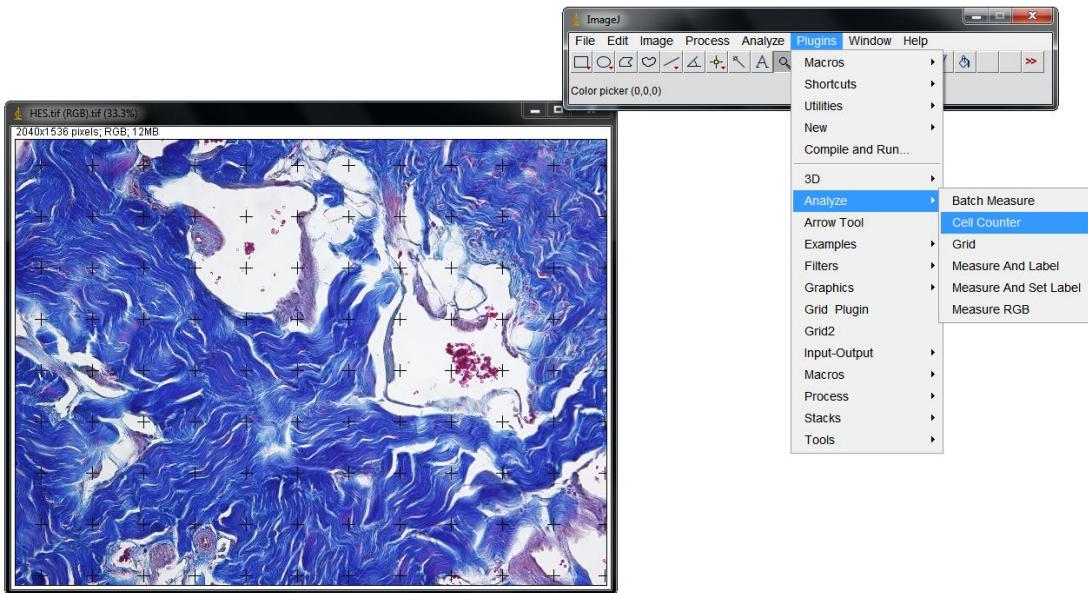
Nota: Imagem do corte transversal do pênis do rato hipertenso tratado com sildenafil, grupo HES, objetiva de 20x, aberta no software *Image J*.

Figura 16 – Recurso *cell counter* para quantificação no software Image J

A



B

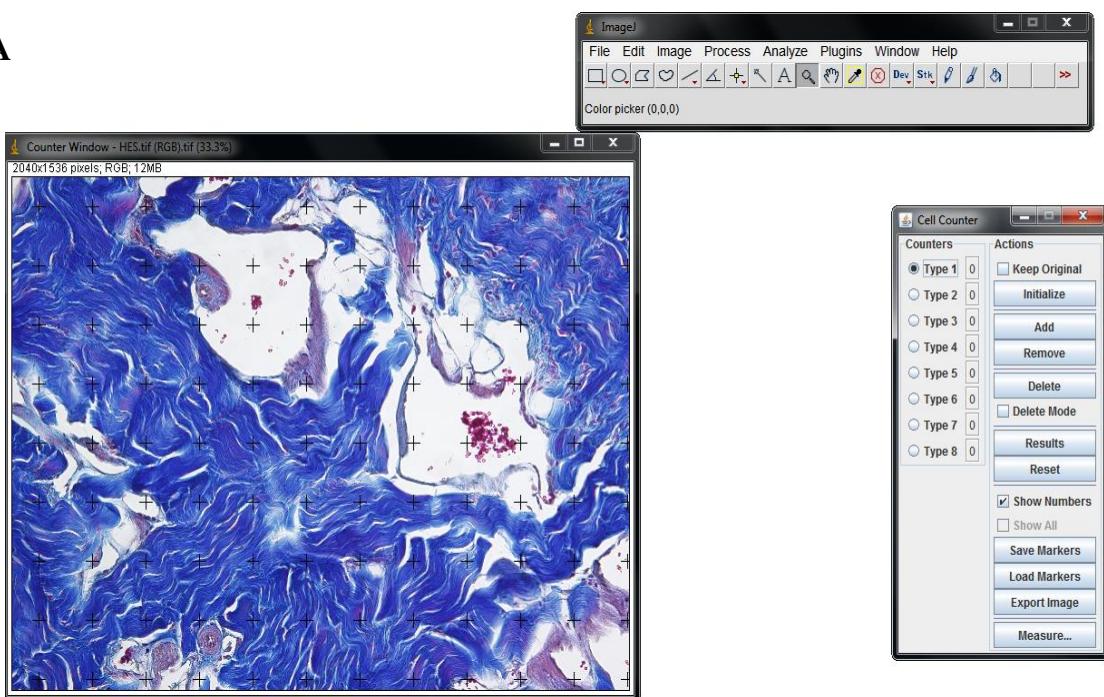


Legenda: Em A, a imagem mostra a grade de 99 pontos (cruzes) sobreposta à fotomicrografia. Em B, a imagem mostra como abrir a ferramenta *cell counter*, clicando na opção plugin, *analyze*, *cell counter*.

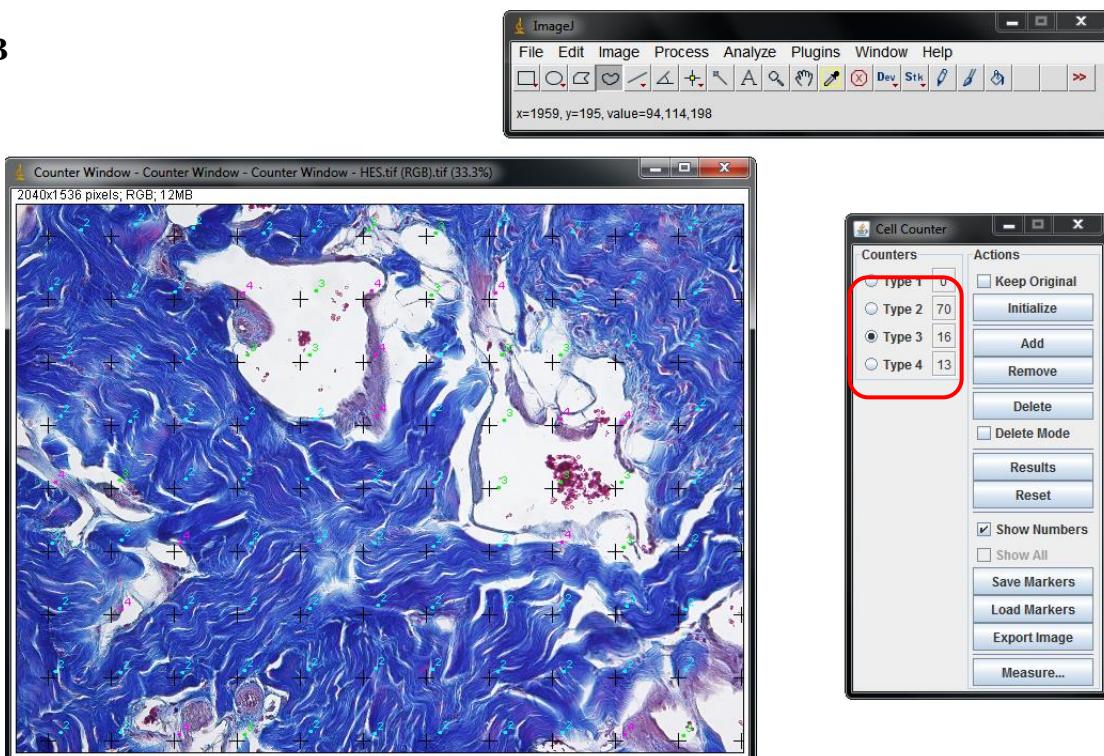
Nota: Imagem do corte transversal do pênis do rato hipertenso tratado com sildenafil, grupo HES, objetiva de 20x, aberta no software Image J.

Figura 17- Apresentação do resultado pela ferramenta *cell counter*, método de contagem de pontos no software Image J

A



B



Legenda: Em A, a imagem mostra a grade de 99 pontos (cruzes) sobreposta a fotomicrografia, com a janela *cell counter* aberta. Em B, na janela *cell couter*, o resultado para a quantidade de cliques realizados em cada tipo de estrutura, Tipo 2 (azul) – Tecido conjuntivo, tipo 3 (verde) – sinusóide, tipo 4 (rosa) músculo liso.

Nota: Imagem do corte transversal do pênis do rato hipertenso tratado com sildenafil, grupo HES, objetiva de 20x, aberta no sotware Image J.

#### 2.4.3 Densidade de proliferação celular

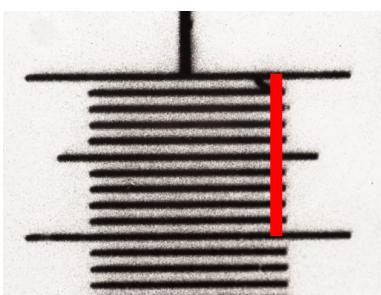
A densidade de proliferação celular nos corpos cavernosos foi quantificada pelo número de células em proliferação por  $\text{mm}^2$ . Para tal quantificação, fotomicrografias dos cortes imunomarcados com anticorpo anti-PCNA, foram capturadas com magnificação de 600x, e analisadas no software *Image J*.

Para mensuração do campo analisado, expresso em  $\text{mm}^2$ , foi realizada a calibração do software com a fotomicrografia da régua milimetrada na objetiva de 60x (Figura 18) nas mesmas condições que as fotomicrografias das lâminas imunomarcadas com anticorpo anti-PCNA.

Os passos para calibração do software foram os mesmos apresentados anteriormente, porém com imagem da régua capturada com objetiva de 60x (Figura 19). Após a calibração, foi necessário calcular a área da imagem, pois apresentamos esse resultado em células/área. Para isso, faz-se necessário abrir a imagem e clicar na opção *analyze, measure* (Figura 20). Após conhecimento a área das imagens em  $\text{mm}^2$ , iniciamos a contagem dos núcleos imunomarcados pelo PCNA. O número de núcleos imunomarcados foi quantificado com o recurso *cell counter* no software *Image J* (Figura 21 e 22). Cabe ressaltar que não há a necessidade de calcular a área de todas as imagens, pois estas possuem a mesma área, já que foram fotografadas nas mesmas condições.

Para utilização do *plugin cell counter*, clicamos na opção *plugins, analyse* (dentro da opção *plugins*), e selecionamos a ferramenta *cell counter*. É importante ressaltar que dependendo da versão ou configuração do software *Image J*, esta opção pode estar dentro de outra opção do software ou na raiz da opção *plugins*.

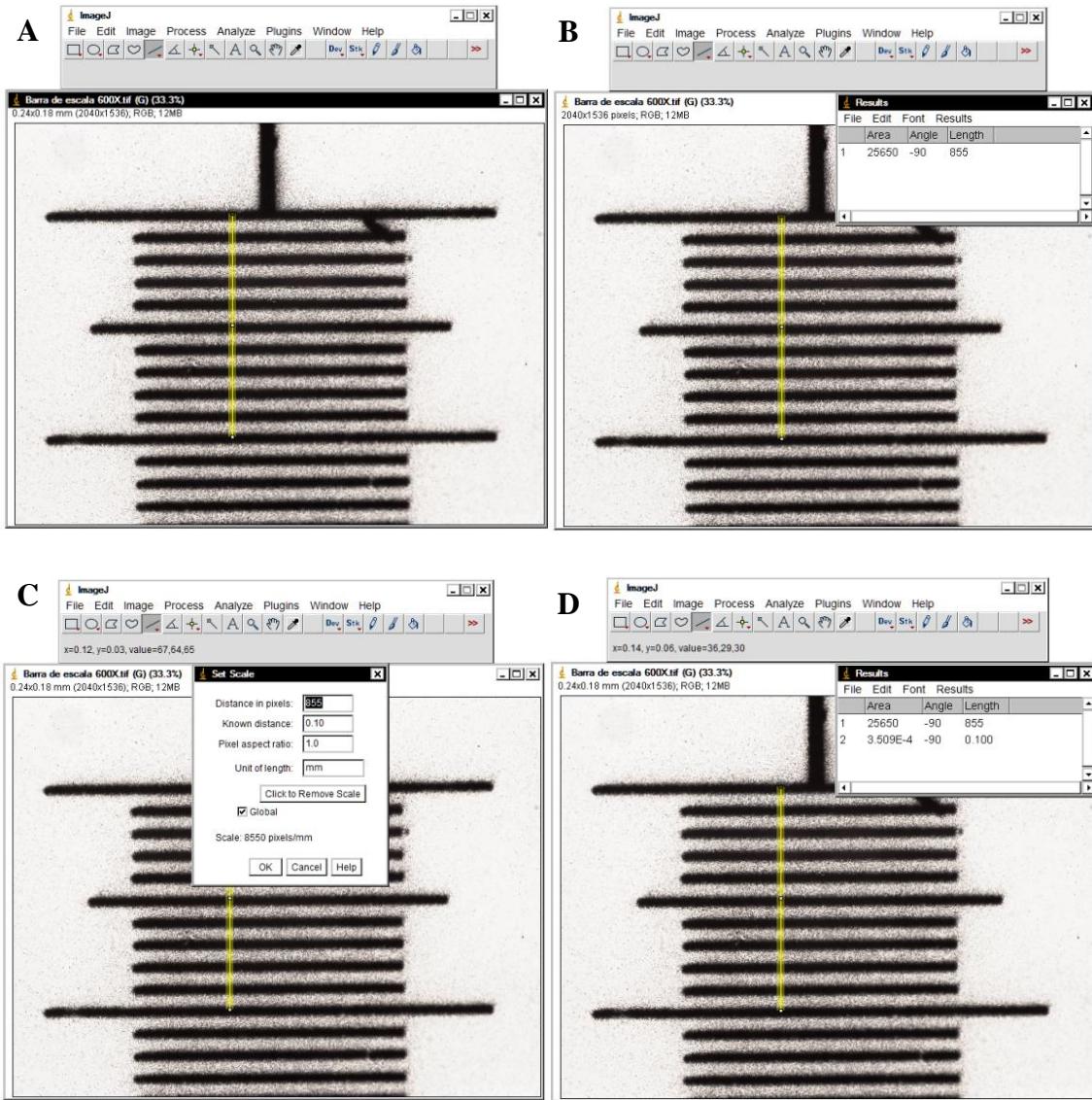
Figura 18 – Fotomicrografia da régua milimetrada utilizada para calibrar o software *image J*, objetiva de 60x



Legenda: A linha em vermelho marca a distância de 0,1 milímetro.

Nota: Régua utilizada para quantificação da densidade de núcleos celulares em proliferação.

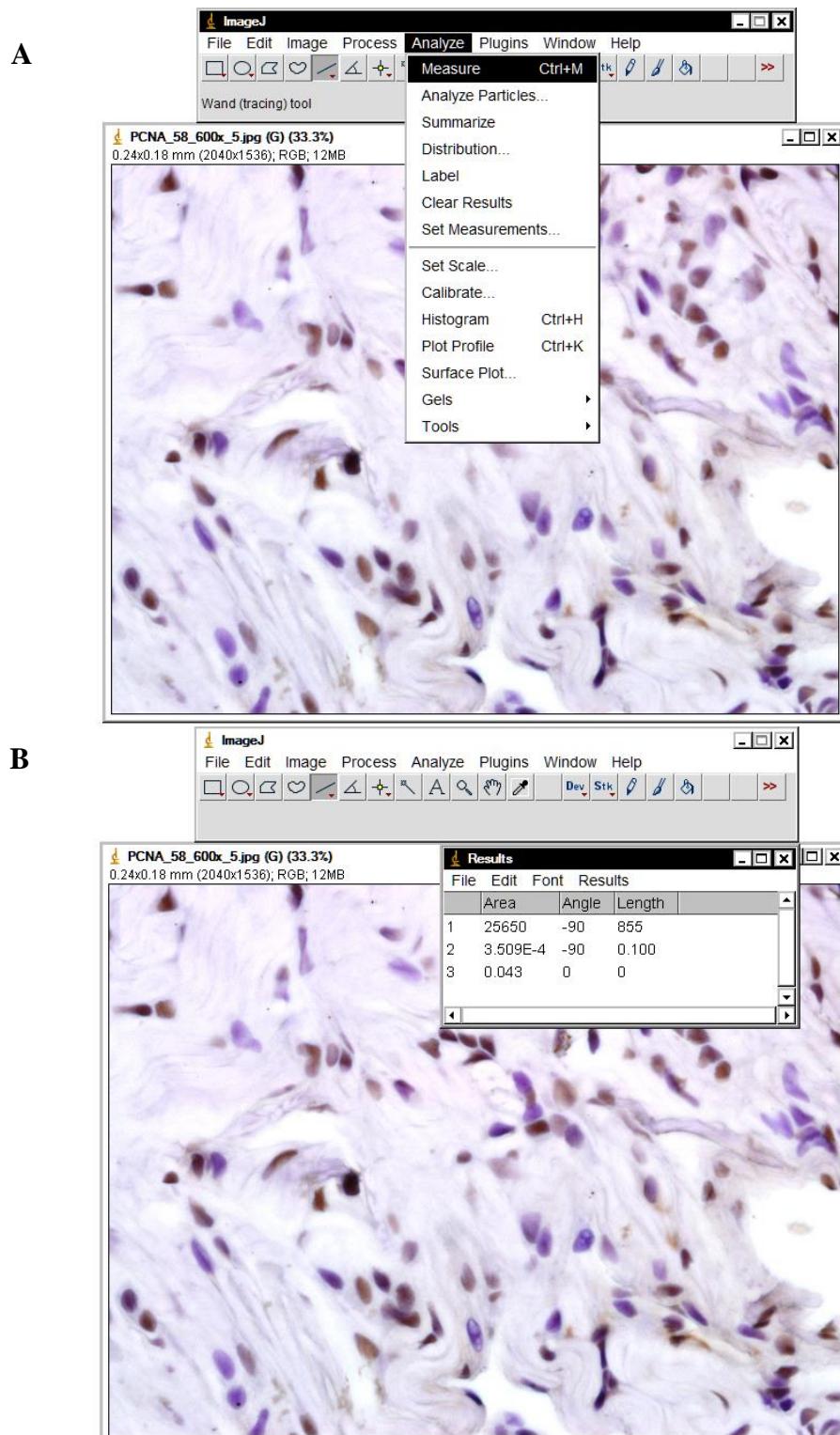
Figura 19 – Utilização da régua milimetrada, objetiva de 60x, para calibrar o software *Image J*



Legenda: Em A, marcação da distância em pixel. Em B, o resultado da distância em pixel. Em C, configuramos o sistema para apresentação dos resultados em mm. Em D, o resultados da distância marcada em mm.

Nota: Régua milimetrada objetiva de 60x. Software *Image J*

Figura 20 – Mensuração da área da imagem, após calibração, para expressar o resultado em células por área, software *Image J*

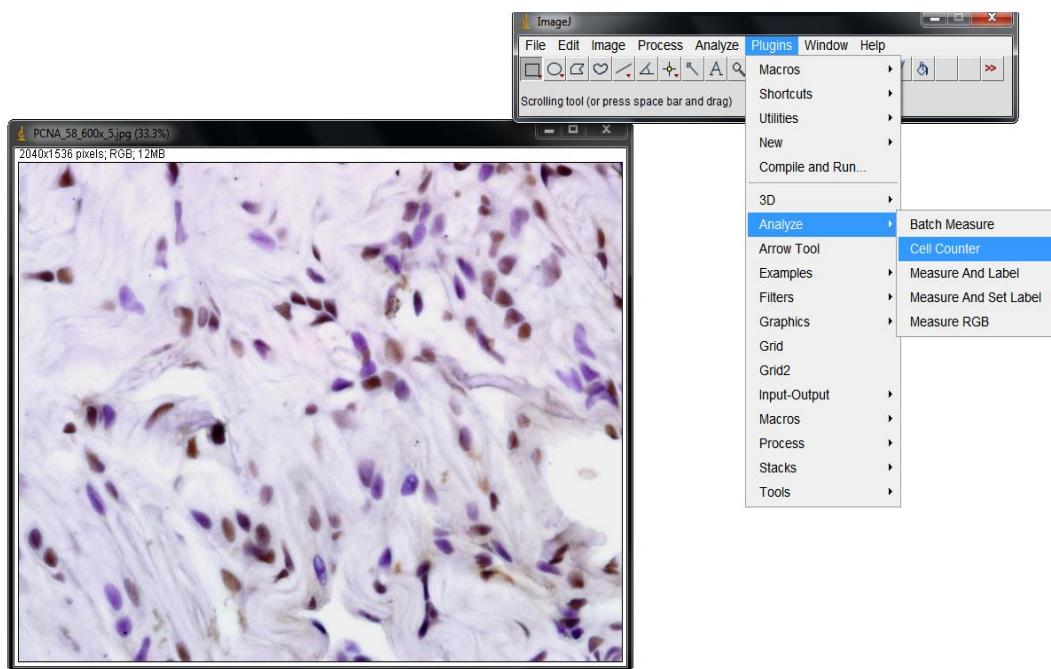


Legenda: Em A, mostramos o processo de mensuração da área da imagem. Em B, mostramos o resultado das três mensurações realizadas: a primeira, a distância em pixels; a segunda, a distância em mm; e a terceira, a da área da imagem em  $\text{mm}^2$ .

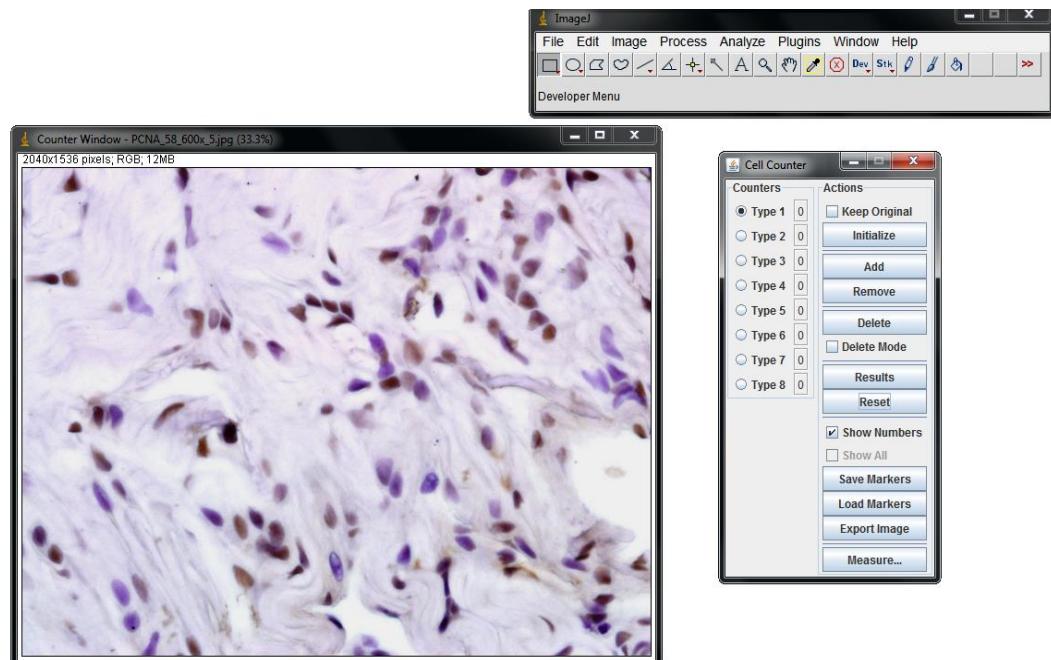
Nota: Imagem do corte transversal do pênis do rato hipertenso, grupo H, imunomarcado com anti-PCNA, objetiva de 60x, aberta no software Image J.

Figura 21 – Utilização do recurso *cell counter* para quantificar o número de células no software *Image J*

A



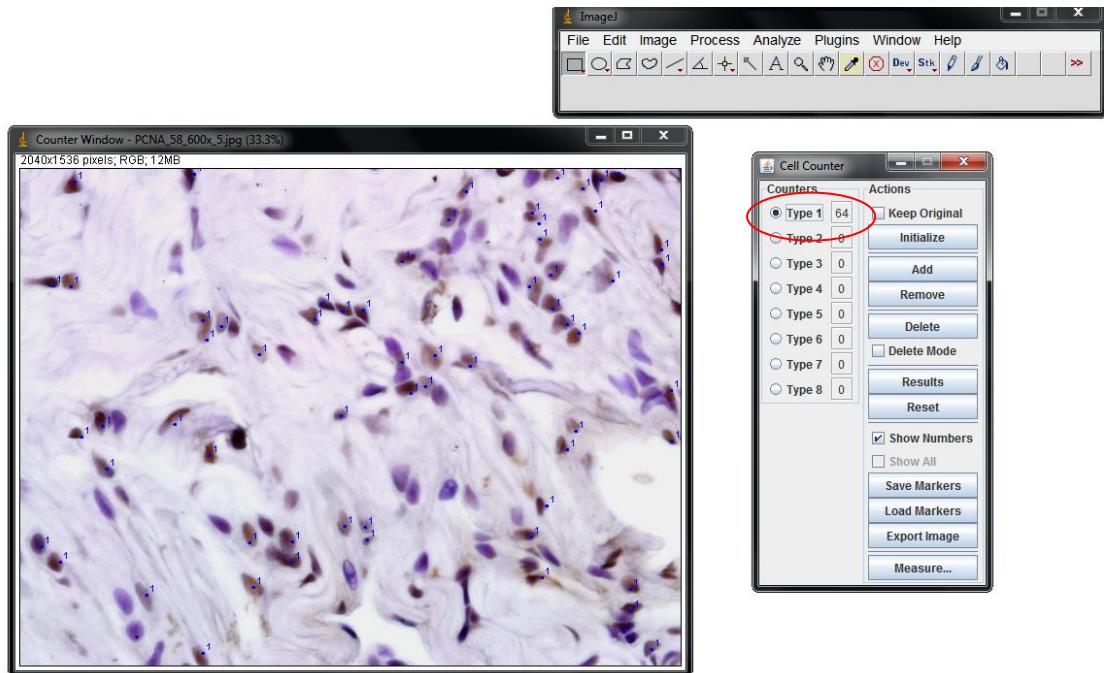
B



Legenda: Em A, a imagem mostra como abrir a ferramenta *cell counter*, clicando na opção *plugin, analyse, cell counter*. Em B, a janela *cell counter* aberta.

Nota: Imagem do corte transversal do pênis do rato hipertenso, grupo H, imunomarcado com anti-PCNA, objetiva de 60x, aberta no software Image J.

Figura 22 - Apresentação do resultado pela ferramenta *cell counter* para o número de densidade de células, no software *Image J*



Legenda: A imagem mostra a quantificação sendo realizada em um dos campos do corpo cavernoso do corte imunomarcado pelo anti-PCNA. A quantidade de cliques em cada celula é contabilizado pelo recurso *cell counter* (circulo vermelho).

Nota: Imagem do corte transversal do pênis do rato hipertenso, grupo H, imunomarcado com anti-PCNA, objetiva de 60x, aberta no software Image J.

## 2.5 Análise estatística

Para cada parâmetro os resultados foram analisados, em primeiro lugar, por meio do teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados paramétricos foram comparados por ANOVA com pós-teste de *Bonferroni*, enquanto os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas com o software *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). As diferenças das médias foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

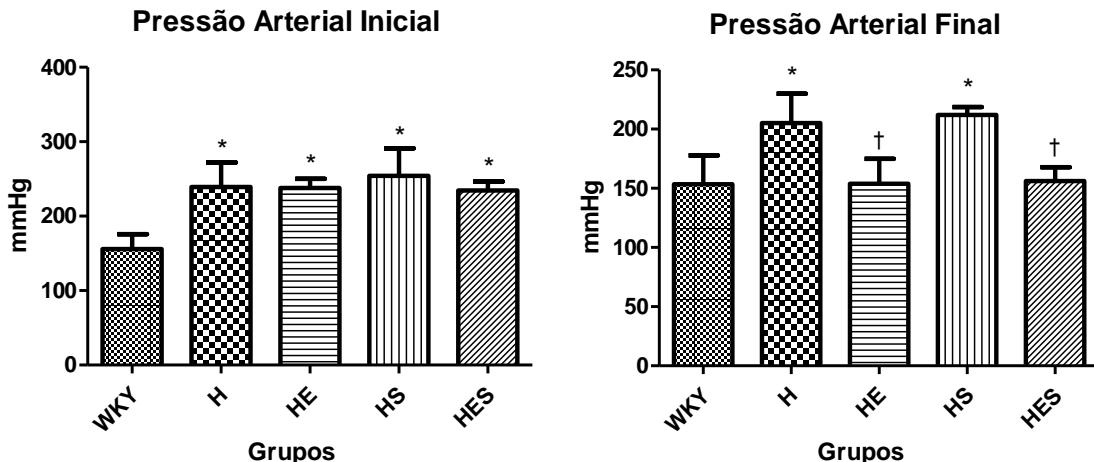
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Pressão arterial

No inicio do experimento, todos os animais SHR (grupos H, HE, HS e HES) apresentavam pressão arterial acima de 204 mmHg, estatisticamente superior aos animais normotensos (WKY) que apresentaram pressão arterial abaixo de 172 mmHg, confirmando o modelo experimental usado.

Ao final do estudo, os animais que receberam enalapril (HE e HES) apresentaram pressão arterial semelhante aos do grupo WKY. Os animais dos grupos H e HS permaneceram hipertensos. Os dados da pressão arterial no início e no final do experimento encontram-se na Figura 23 e na tabela 1.

Figura 23 – Gráficos da pressão arterial inicial e final



Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE - ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; \* - representa diferença estatística de WKY; † - representa diferença estatística de H.

Tabela 1: Medidas de pressão arterial a partir de 120 dias de idade (início do tratamento) e 160 dias de idade (conclusão do tratamento). Dados dos ratos normotensos (WKY), ratos hipertensos não tratados (H) e ratos hipertensos tratados com enalapril (HE), sildenafil (HS), ou da combinação de enalapril e sildenafil (HES).

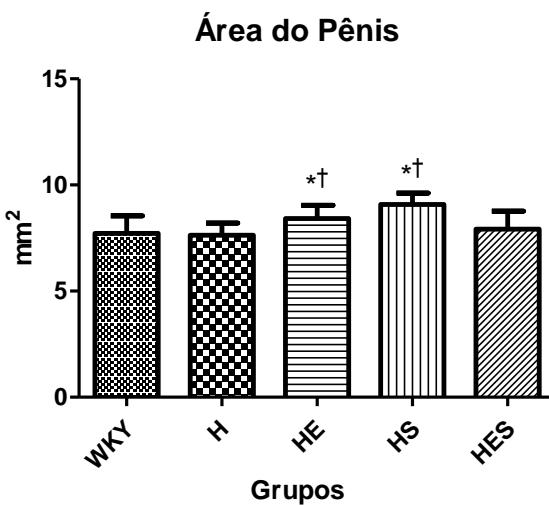
	WKY	H	HE	HS	HES	Valor de p
Pressão sanguínea inicial (mmHg)	155,7 ± 20,0	239,2 ± 33,1*	237,7 ± 12,5*	254,1 ± 37,0*	234,4 ± 12,0*	<0,0001
Pressão sanguínea final (mmHg)	153,4 ± 24,4	205,1 ± 24,8*	153,9 ± 21,0†	212,1 ± 6,5*	156,2 ± 11,5†	<0,0001

Os dados apresentados como média ± desvio padrão. Para cada parâmetro, \* representa diferença estatística de WKY; † representa diferença estatística de H.

### 3.2 Área do corte transversal do pênis

Não houve diferença no diâmetro da secção transversal do pênis dos animais hipertensos (H) em comparação com os animais normotensos (WKY). No entanto, os animais tratados com enalapril (HE) e com o sildenafil (HS) apresentaram aumento na área da secção transversal em relação ao grupo WKY de 9% e 17%, respectivamente, enquanto os animais que receberam a combinação destes medicamentos (HES) não mostraram nenhuma alteração na área do corte transversal do pênis quando comparado ao grupo WKY (Figura 24 e tabela 2).

Figura 24 – Gráfico da área do corte transversal do pênis ( $\text{mm}^2$ )



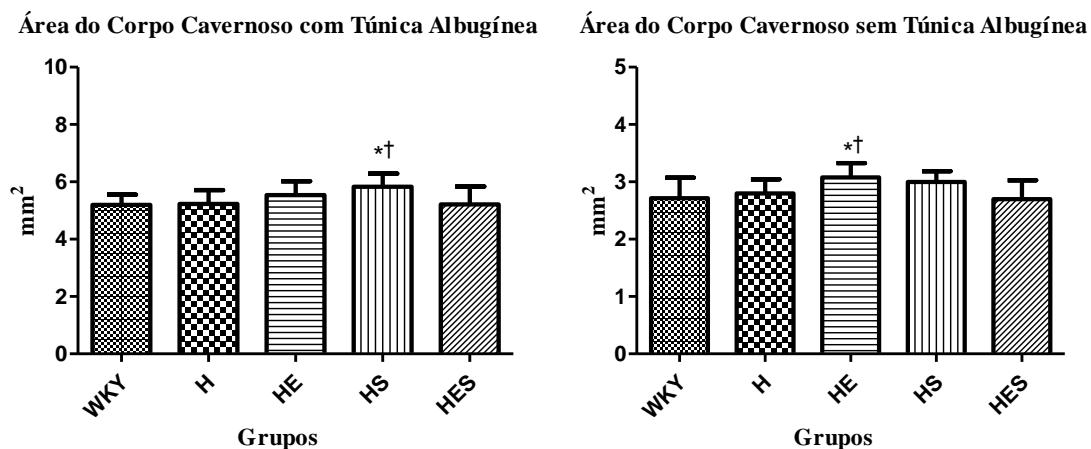
Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE - ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; \* - representa diferença estatística de WKY; † - representa diferença estatística de H.

### 3.3 Área do corte transversal do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea

A área do corte transversal do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea foi semelhante entre os grupos H e WKY. A área do corpo cavernoso, sem a túnica albugínea foi 13% maior nos animais que receberam enalapril (grupo HE), quando comparados ao grupo WKY. O corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea, no grupo tratado com o sildenafil

(grupo HS) aumentou em 12% e 10%, respectivamente, em comparação com o grupo de animais WKY. O grupo que recebeu tratamento com associação dos medicamentos (grupo HES) não mostrou nenhuma mudança na área do corte transversal do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea, em comparação com o grupo de animais WKY normotensos (Figura 25 e tabela 2).

Figura 25 – Gráfico da área do corte transversal do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea

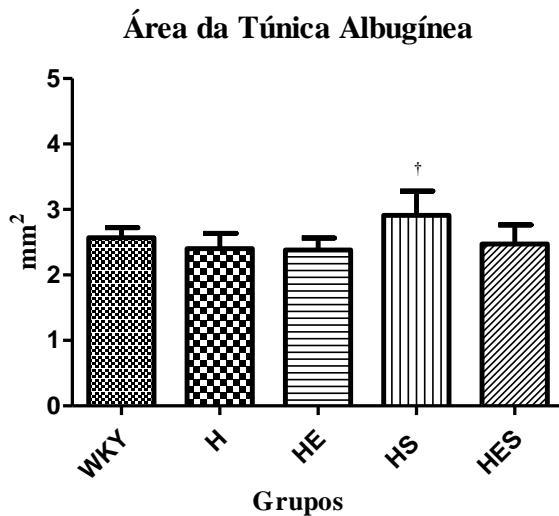


Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE - ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; \* - representa diferença estatística de WKY; † - representa diferença estatística de H.

### 3.4 Área do corte transversal da túnica albugínea

A área do corte transversal da túnica albugínea foi semelhante no grupo H e os grupos WKY. Os animais nos grupos HE, HS, e HES não apresentaram mudanças significativas na área do corte transversal da túnica albugínea, em comparação com o grupo WKY. No entanto, o grupo HS mostrou aumento de 21% na área do corte transversal da túnica albugínea, quando comparado ao grupo H (Figura 26 e tabela 2).

Figura 26 - Gráfico da área do corte transversal da túnica albugínea

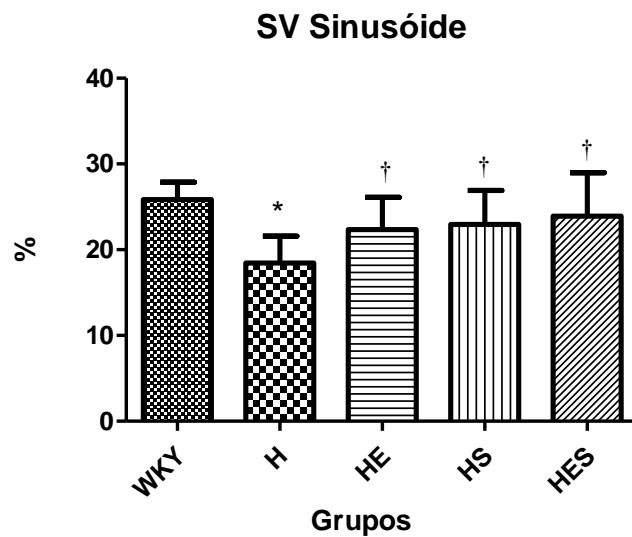


Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; † - representa diferença estatística de H.

### 3.5 Densidades de espaço sinusoidal no corpo cavernoso

A análise da densidade do espaço sinusoidal mostrou redução de 33% no grupo H, em comparação com o grupo WKY, enquanto que a densidade dos grupos tratados (HE, HS e HES) foi igual à do grupo WKY (Figura 27, Figura 31 e tabela 2).

Figura 27 - Gráfica da densidade de espaço sinusoidal no corpo cavernoso

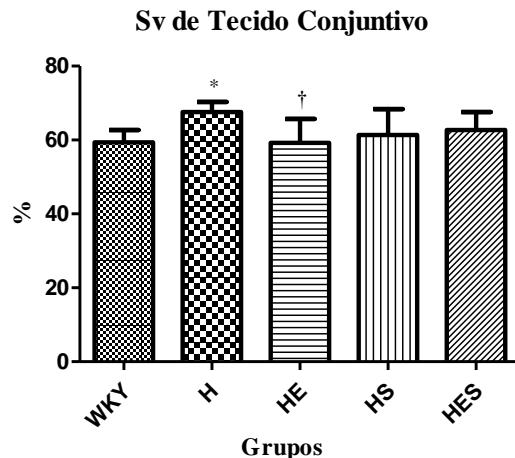


Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; \* - representa diferença estatística de WKY; † - representa diferença estatística de H.

### 3.6 Densidades de tecido conjuntivo no corpo cavernoso

Ao analisar o tecido conjuntivo pelo método de planimetria de contagem de ponto, observou-se aumento de 13% na densidade do tecido conjuntivo no grupo H em comparação com o grupo WKY. Os grupos HE, HS, e HES mostraram valores de densidade do tecido conjuntivo semelhantes ao grupo de animais normotensos WKY (Figura 28, Figura 31 e tabela 2).

Figura 28 - Gráfico da densidade de tecido conjuntivo no corpo cavernoso

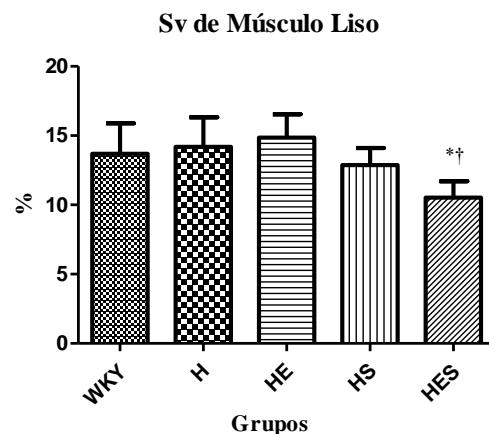


Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; \* - representa diferença estatística de WKY; † - representa diferença estatística de H.

### 3.7 Densidade de músculo liso do corpo cavernoso

A densidade do músculo liso dos corpos cavernosos foi 23% menor no grupo HES, em comparação com o grupo WKY. Os grupos H, HE e HS mostraram densidades semelhantes ao grupo WKY (Figura 29, Figura 31 e tabela 2).

Figura 29 - Gráfico da densidade de músculo liso no corpo cavernoso

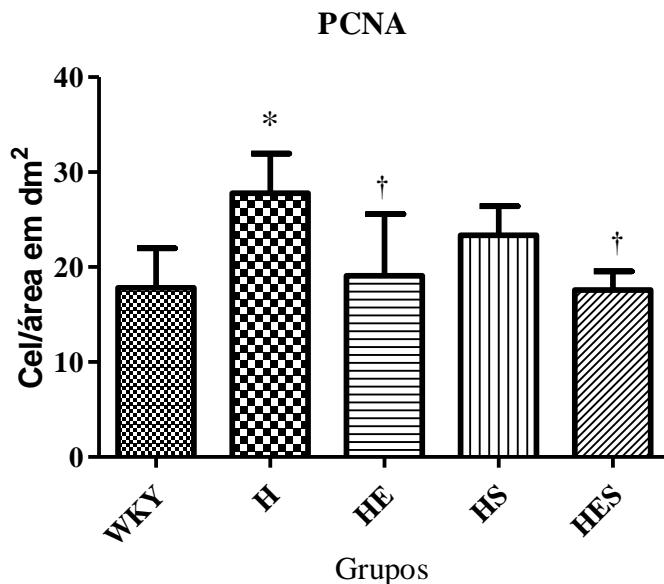


Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; \* - representa diferença estatística de WKY; † - representa diferença estatística de H.

### 3.8 Densidade de células em proliferação por área

A análise da proliferação celular, pelo método imunohistoquímico, com anticorpo anti-PCNA mostrou aumento de 50% de células positivas no corpo cavernoso do grupo H, enquanto que os valores nos grupos HE, HS, e HES foram semelhantes em comparação com o grupo de ratos WKY (Figura 30, Figura 32 tabela 2). Este resultado foi apresentado em decímetros quadrados ( $\text{dm}^2$ ) na tabela 2.

Figura 30 - Gráfico da densidade de células em proliferação no corpo cavernoso



Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; \* - representa diferença estatística de WKY; † - representa diferença estatística de H.

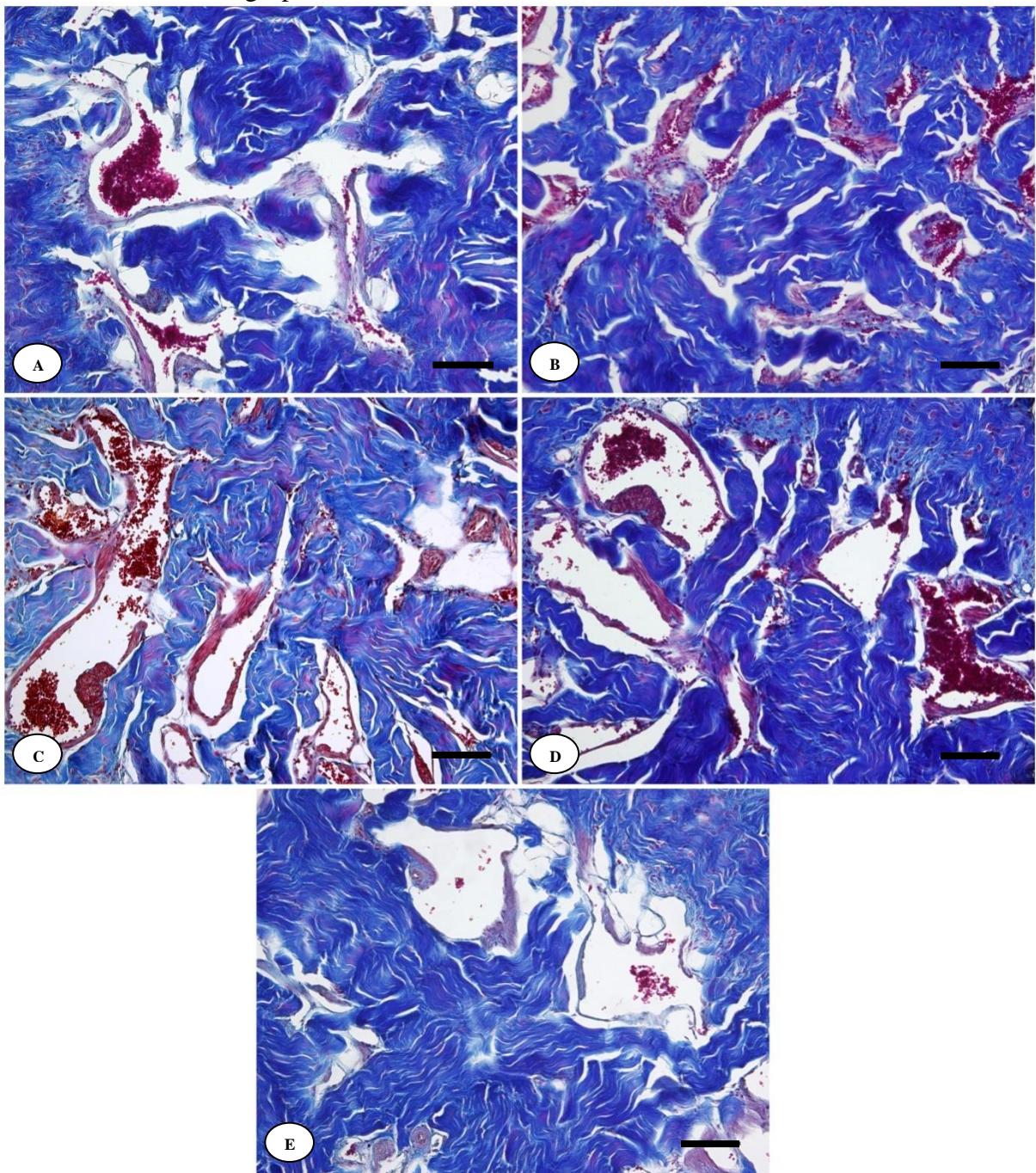
Tabela 2: Dados morfométricos penianos dos ratos normotensos (WKY), ratos hipertensos não tratados (H) e ratos hipertensos tratados com enalapril (HE), sildenafil (HS), ou da combinação de enalapril e sildenafil (HES)

	WKY	H	HE	HS	HES	Valor de p
<b>Área do corte transversal do pênis (mm<sup>2</sup>)</b>	7,71 ± 0,8	7,63 ± 0,6	8,42 ± 0,6* <sup>†</sup>	9,08 ± 0,5* <sup>†</sup>	7,92 ± 0,8	<0,0001
<b>Área do corpo cavernoso com túnica (mm<sup>2</sup>)</b>	5,19 ± 0,3	5,23 ± 0,5	5,54 ± 0,5	5,83 ± 0,4* <sup>†</sup>	5,21 ± 0,6	0,0012
<b>Área do corpo cavernoso sem túnica (mm<sup>2</sup>)</b>	2,71 ± 0,3	2,80 ± 0,2	3,08 ± 0,2* <sup>†</sup>	3,00 ± 0,2*	2,70 ± 0,3	<0,0001
<b>Área de túnica albugínea (mm<sup>2</sup>)</b>	2,57 ± 0,1	2,40 ± 0,2	2,38 ± 0,2	2,90 ± 0,3 <sup>†</sup>	2,48 ± 0,3	0,0124
<b>Sv sinusoidal (%)</b>	25,86 ± 2,0	17,15 ± 3,3*	22,36 ± 3,7 <sup>†</sup>	22,34 ± 4,5 <sup>†</sup>	25,79 ± 4,5 <sup>†</sup>	<0,0001
<b>Sv de tecido conjuntivo (%)</b>	59,40 ± 3,3	67,55 ± 2,7*	59,26 ± 6,4 <sup>†</sup>	61,36 ± 7,0	62,69 ± 4,9	0,0013
<b>Sv de músculo liso (%)</b>	13,70 ± 2,2	14,19 ± 2,1	14,86 ± 1,7	12,87 ± 1,2	10,52 ± 1,2* <sup>†</sup>	0,0002
<b>PCNA (celulas/dm<sup>2</sup>)</b>	18,03 ± 3,1	27,94 ± 3,2*	19,51 ± 4,5 <sup>†</sup>	23,44 ± 2,3	17,63 ± 1,5 <sup>†</sup>	0,0009

Dados apresentados como média ± desvio padrão. Para cada parâmetro, \* representa diferença estatística de WKY; † representa diferença estatística de H.

Nota: Sv = densidade de superfície, PCNA = antígeno de proliferação celular

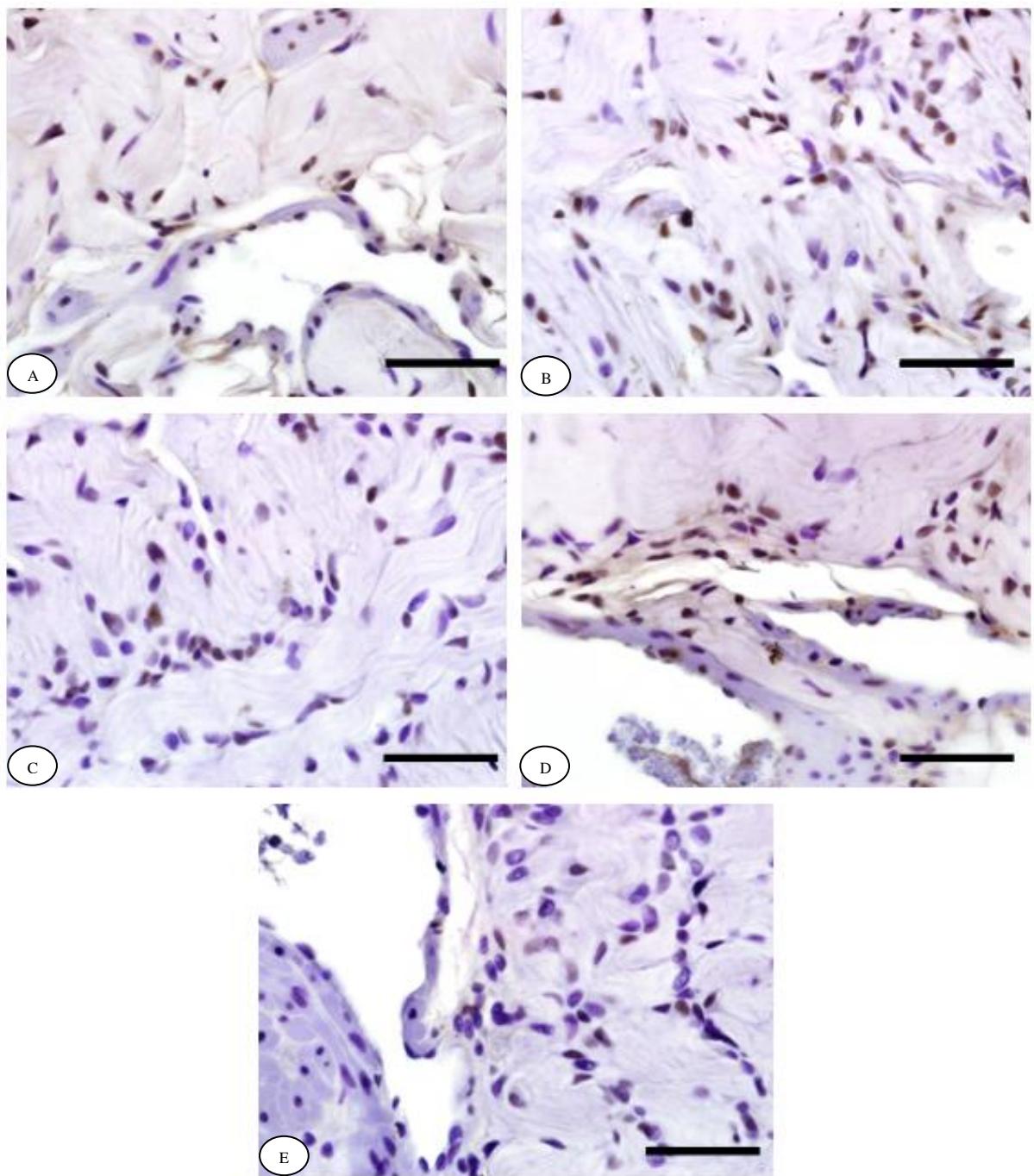
Figura 31 - Imagem comparando as estruturas dos corpos cavernosos do pênis de ratos nos diferentes grupos



Legenda: Fotomicrografias do corpo cavernoso do pênis. Em (A), ratos normotensos (WKY), (B) ratos hipertensos não tratados (H), (C) ratos hipertensos tratados com enalapril (HE), (D) ratos hipertensos tratados com sildenafil (HS), e (E) ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil (HES). As Fotomicrografias mostram redução do espaço sinusoidal e aumento do tecido conjuntivo em animais do grupo H em comparação com outros grupos (WKY, HE, HS, e HES).

Nota: Tricrômico de Masson, 200x. As barras de escala representam 100 µm.

Figura 32 - Imagem comparando células imunomarcadas no corpo cavernoso dos pênis de ratos nos diferentes grupos



Legenda: Fotomicrografias do corpo cavernoso do pênis. Em (A) ratos normotensos (WKY), (B) ratos hipertensos não tratados (H), (C) ratos hipertensos tratados com enalapril (HE), (D) ratos hipertensos tratados com sildenafil (HS), e (E) ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil (HES). As Fotomicrografias mostram aumento de células em proliferação no grupo H e os grupos HE, HS e HES semelhantes ao grupo WKY.

Nota: Imunohistoquímica, anti-PCNA, 600x. As barras de escala representam 100 µm.

#### 4 DISCUSSÃO

A disfunção endotelial desempenha papel importante na HAS e na DE, em abas as afecções ocorre prejuizo ao relaxamento do músculo liso. O relaxamento adequado do músculo liso é fundamental para o controle da pressão arterial e para promover a intumescência do corpo cavernoso (11).

A linhagem de SHR é comumente usada como modelo animal para estudos de hipertensão, incluindo estudos com foco na DE (48-50). Neste modelo, foi mostrado que a hipertensão induz alterações morfológicas no corpo cavernoso com aumento de colágeno e do músculo liso (35, 51). Embora o músculo liso não ter aumentado em nosso estudo, o tecido conjuntivo da trabécula do corpo cavernoso, composto principalmente de colágeno, aumentou nos ratos hipertensos.

O aumento da quantidade de tecido conjuntivo no corpo cavernoso é altamente associado com a fibrose do pênis e é observado em pacientes com DE (52). Fibrose peniana também está relacionada ao envelhecimento, diabetes mellitus, lesão do nervo cavernoso, estresse crônico e na privação de androgênio (6, 43, 53).

Estudos anteriores, ao analizar os efeitos em longo prazo da hipertensão em ratos SHR, relataram aumento de músculo liso nos corpos cavernosos (35, 51). Diferente dos achados do nosso estudo, em que os animais foram submetidos à eutanásia aos cinco meses de idade, os autores avaliaram histologicamente o pênis de ratos com oito meses de idade. Assim, o aumento do músculo liso pode ocorrer mais tarde do que as alterações de outros componentes do tecido peniano, como por exemplo, o tecido conjuntivo.

Foi mostrado que a hipertensão produz importantes alterações vasculares nos corpos cavernosos. Estudos anteriores apontaram que o músculo liso do corpo cavernoso aumenta em resposta à hipertensão arterial (34). Além disso, a hipertensão leva a anormalidades endoteliais por tensão de cisalhamento, que culmina em produção alterada de substâncias vasoativas, aumento da proliferação de células endoteliais, e maior permeabilidade da íntima. Essas alterações podem ser a causa de hipóxia do tecido cavernoso, que tem sido apontada como uma das causas de DE (34).

A baixa tensão de oxigênio no tecido cavernoso estimula a expressão do fator transformador de crescimento  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) e inibi a síntese de prostaglandina E (34). Em estudos realizados em cultura de células, foi demonstrado que o TGF-  $\beta 1$  provoca o aumento da síntese de colágeno em duas a quatro vezes. Além disso, a prostaglandina E parece ser

responsável por suprimir o TGF- $\beta$ 1 induzindo a maior síntese de colágeno. Assim, a fibrose peniana vista em ratos hipertensos em estudos anteriores e no presente estudo, pode ser consequência do aumento TGF $\beta$ 1 resultante da hipóxia (34).

De forma interessante, estas alterações foram prevenidas ou revertidas pelos tratamentos utilizados. O tratamento com anti-hipertensivo se mostrou eficaz em reverter ou prevenir as alterações vasculares causadas pela hipertensão, mantendo a pressão arterial em valores normais (54). Além disso, os inibidores da PDE5 aumentam a tensão de oxigênio tecidual no pênis por atuar no relaxamento da musculatura lisa, aumentando o influxo de sangue no pênis (55). Estas poderiam ser possíveis explicações para os bons resultados encontrados nos nossos grupos tratados.

A quantidade de células marcadas pelo anticorpo anti-PCNA nos corpos cavernosos de animais hipertensos foi maior do que a observada em animais do grupo normotenso. Embora essas células em proliferação não tenham sido identificadas, pode-se supor que os fibroblastos, as células mais comuns no corpo cavernoso de ratos, estejam envolvidos neste processo (29). Isto seria consistente com a fibrose observada nestes animais. Dessa forma, este parâmetro não apresentou aumento nos grupos tratados, o que corrobora com os resultados de outros parâmetros nestes grupos.

Conforme relatado anteriormente por outros autores, a morfologia e a função do corpo cavernoso estão intimamente relacionadas, e qualquer alteração estrutural pode levar à ou ser consequência de DE (6, 30, 43). A hipertensão tem sido relacionada com algum prejuízo na ereção peniana medida pela pressão intracavernosa em SHR (36). Este achado confirma que existe relação importante entre a morfologia e a função do pênis no modelo SHR, assim como em outros modelos de DE. Portanto, estudos morfológicos dos corpos cavernosos, no modelo de SHR, podem ser considerados de interesse para a compreensão da função erétil na hipertensão.

No presente estudo, a redução da densidade do espaço sinusoidal encontrada em animais hipertensos, pode ser consequência da pressão intracavernosa diminuída, como já relatado em SHR (36). Neste caso, os sinusóides podem não ser capazes de comprimir as veias circunflexas profundas contra a túnica albugínea, resultando em fuga venosa e baixa pressão intracavernosa (53).

Todos os grupos tratados mostraram densidade do espaço sinusoidal normal, o que indica que o controle da pressão arterial ou melhora do relaxamento da musculatura lisa, promovido pelo sildenafil, permitiu adequada manutenção da pressão intracavernosa.

O tratamento também mostrou ter impedido mudanças no tecido conjuntivo trabecular. O grupo que recebeu apenas enalapril (HE) não mostrou nenhuma evidência de fibrose no pênis, enquanto os grupos que receberam sildenafile (HS e HES) mostraram resultados que podem ser considerados como intermediário em comparação com os ratos hipertensos não tratados e normotensos, pois não houve diferença estatística.

Em relação ao músculo liso, o grupo que recebeu ambos os medicamentos (HES) mostrou pior resultado em comparação com os outros grupos. Neste caso, é possível que as drogas tenham efeitos antagônicos. Foi previamente mostrado que o sildenafile e vardenafil impedem a fibrose e mantém em padrões normais a quantidade de músculo liso em dois modelos diferentes de DE em ratos (56, 57). São necessárias outras investigações sobre o porquê do sildenafile (isolado ou em combinação com enalapril) não ter sido tão eficaz em ratos SHR em comparação com os resultados encontrados em outros modelos. No entanto, os grupos que receberam o inibidor de PDE5 (HS e HES) mostraram morfologia cavernosa mais próxima do normal, do que os animais hipertensos sem as medicações (H).

Em nosso estudo observamos que tanto as áreas do corte transversal do pênis como as do corpo cavernoso foram aumentadas em ambos os grupos tratados com enalapril (HE) e sildenafile (HS). Podemos considerar este achado como um efeito positivo destas drogas. A melhora da perfusão dos corpos cavernosos nestes grupos, como demonstrado pelo aumento da densidade do espaço sinusoidal, pode ser a base deste aumento. Curiosamente, o grupo que recebeu a terapia combinada não mostrou esse benefício, novamente indicando o que parece ser um efeito antagônico destas drogas. Outros estudos que investiguem a ação dessas drogas usadas em combinação se fazem necessários. É importante lembrar que o sildenafile foi usado diariamente em nosso estudo. O uso sob demanda de sildenafile (somente quando o paciente for ter relação sexual), isoladamente ou em combinação com o uso contínuo de enalapril, pode não ter os mesmos efeitos como visto em nosso estudo.

A HAS promove alterações morfológicas nos corpos cavernosos como foi relatado anteriormente (34-36, 51, 59). O enalapril foi capaz de prevenir estas alterações, provavelmente por ter reduzido a pressão sanguínea. Com base em nossos resultados, o enalapril, ou outros inibidores da ECA, podem ser uma boa escolha para o tratamento de pacientes hipertensos com algum grau de disfunção erétil que não fazem uso de inibidores da PDE5. Isso também está de acordo com a literatura que aponta os inibidores da ECA como uma boa opção para os pacientes com DE em que a terapia com inibidor PDE5 não é indicada (18).

Embora o uso de inibidores da PDE5 para o tratamento da hipertenção não seja recomendado, o uso de sildenafil por automedicação em pacientes hipertensos não diagnosticados, justifica o interesse por este grupo (59, 60). Em nosso estudo, o sildenafil manteve a morfologia dos corpos cavernosos em ratos SHR, apesar da persistência de pressão sanguínea elevada.

Algumas limitações do estudo devem ser apontadas. Uma vez que o pênis dos ratos e dos seres humanos têm estruturas diferentes, o uso deste modelo animal pode ser considerado como uma limitação. No entanto, ambas as espécies têm os mesmos componentes estruturais e verifica-se que estes componentes respondem de maneira semelhante quando expostos a diferentes condições experimentais (29, 43). Outro ponto importante é o fato de que a DE é geralmente multifatorial, envolvendo condições tais como idade, obesidade e hipogonadismo, além de hipertensão (18, 61). No modelo SHR, a hipertensão é uma doença primária e isolada que não corresponde à situação clínica típica. Além disso, pacientes hipertensos comumente são tratados com uma combinação de anti-hipertensivos. Como o presente estudo utilizou apenas uma classe de anti-hipertensivo, esta situação pode não corresponder à condição clínica mais comum. Outros estudos que investiguem a combinação de medicamentos anti-hipertensivos podem ser úteis para o clínico.

Outras investigações que expliquem os mecanismos pelos quais a hipertensão está relacionada com as alterações penianas devem ser abordadas. Este pode ser um passo importante para vias específicas de bloqueadores, com potencial para o desenvolvimento de novas drogas. Uma vez que tanto inibidores da ECA como inibidores da PDE5 mostraram efeitos benéficos, é possível que haja soluções diferentes para o mesmo problema.

## CONCLUSÃO

Em nosso modelo experimental, a HAS promoveu alterações estruturais no corpo cavernoso de SHR que podem estar relacionadas com a DE. Com base em nossos resultados morfológicos, o enalapril pode representar uma opção desejável para o tratamento da hipertensão em pacientes nos quais a função erétil é uma preocupação. O sildenafil em uso contínuo manteve a estrutura do corpo cavernoso normal, prevenindo das alterações estruturais observadas em ratos hipertensos não tratados. A utilização de cada uma destas drogas resultou na melhoria da morfologia peniana. No entanto, a combinação destas drogas não promoveu resultados tão benéficos como quando utilizadas de forma isolada.

## REFERENCIAS

1. Bisi Molina Mdel C, Cunha Rde S, Herkenhoff LF, Mill JG. [Hypertension and salt intake in an urban population]. Rev Saude Publica. 2003;37(6):743-50.
2. Ministério da Saúde. Relatório técnico da campanha nacional de detecção de suspeitos de diabetes mellitus. Brasília: Secretaria de Políticas da Saúde, Ministério da Saúde; 2001.
3. NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. JAMA. 1993;270(1):83-90. Albersen M, Mwamukonda KB, Shindel AW, Lue TF. Evaluation and treatment of erectile dysfunction. Med Clin North Am. 2011;95(1):201-12.
4. Albersen M, Mwamukonda KB, Shindel AW, Lue TF. Evaluation and treatment of erectile dysfunction. Med Clin North Am. 2011;95(1):201-12
5. Kubit M, Wagner G, Fugl-Meyer AR. Epidemiology of erectile dysfunction. Int J Impot Res. 2003;15(1):63-71.
6. Costa WS, Carrerete FB, Horta WG, Sampaio FJ. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. BJU Int. 2006;97(3):567-9.
7. Hannan JL, Kutlu O, Stopak BL, Liu X, Castiglione F, Hedlund P, Burnett AL, Bivalacqua TJ. Valproic acid prevents penile fibrosis and erectile dysfunction in cavernous nerve-injured rats. J Sex Med. 2014;11(6):1442-51.
8. Burchardt M, Burchardt T, Baer L, Kiss AJ, Pawar RV, Shabsigh A, et al. Hypertension is associated with severe erectile dysfunction. J Urol. 2000;164(4):1188-91.
9. Dorrance AM, Lewis RW, Mills TM. Captopril treatment reverses erectile dysfunction in male stroke prone spontaneously hypertensive rats. Int J Impot Res. 2002;14(6):494-7.
10. Gur S, Kadowitz PJ, Gurkan L, Chandra S, Dewitt SY, Harbin A, et al. Chronic inhibition of nitric-oxide synthase induces hypertension and erectile dysfunction in the rat that is not reversed by sildenafil. BJU Int. 2010;106(1):78-83.
11. Nunes KP, Labazi H, Webb RC. New insights into hypertension-associated erectile dysfunction. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2012;21(2):163-70.

12. Boudreau DM, Yu O, Johnson J. Statin use and cancer risk: a comprehensive review. *Expert Opin Drug Saf.* 2010;9(4):603-21.
13. Getzenberg RH. Statins and the risk of prostate cancer or benign prostatic hyperplasia: biological plausibility. *J Urol.* 2010;184(2):415-6.
14. Hale TM, Okabe H, Bushfield TL, Heaton JP, Adams MA. Recovery of erectile function after brief aggressive antihypertensive therapy. *J Urol.* 2002;168(1):348-54.
15. Matityahu A, Rosenzweig N, Golomb E. Rapid proliferation of prostatic epithelial cells in spontaneously hypertensive rats: a model of spontaneous hypertension and prostate hyperplasia. *J Androl.* 2003;24(2):263-9.
16. Sugaya K, Kadekawa K, Ikehara A, Nakayama T, Gakiya M, Nashiro F, et al. Influence of hypertension on lower urinary tract symptoms in benign prostatic hyperplasia. *Int J Urol.* 2003;10(11):569-74; discussion 75.
17. Guo LJ, Tang Y, Guo CM, Zhang XH. Impact of primary hypertension on hematuria of the patients with benign prostatic hyperplasia. *Chin Med J (Engl).* 2010;123(9):1154-7.
18. Javaroni V, Neves MF. Erectile dysfunction and hypertension: impact on cardiovascular risk and treatment. *Int J Hypertens.* 2012;2012:627278.
19. Baumhäkel M, Böhm M. Cardiovascular outcomes with angiotensin II receptor blockers: clinical implications of recent trials. *Vasc Health Risk Manag.* 2011;7:391-7.
20. Ronquist G, Rodriguez LA, Ruigomez A, Johansson S, Wallander MA, Frithz G, et al. Association between captopril, other antihypertensive drugs and risk of prostate cancer. *Prostate.* 2004;58(1):50-6.
21. Ronquist G, Frithz G, Wang YH, Lindeborg T. Captopril may reduce biochemical (prostate-specific antigen) failure following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol.* 2009;43(1):32-6.
22. Gratzke C, Angulo J, Chitaley K, Dai YT, Kim NN, Paick JS, et al. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med.* 2010;7(1 Pt 2):445-75.
23. Aydin S, Ozbek H, Yilmaz Y, Atilla MK, Bayrakli H, Cetin H. Effects of sildenafil citrate, acetylcholine, and sodium nitroprusside on the relaxation of rabbit cavernosal tissue in vitro. *Urology.* 2001;58(1):119-24.
24. Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Aug;5(8):689-702.

25. Marieb E, Hoehn, K. Anatomia e fisiologia. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
26. Zusman RM, Morales A, Glasser DB, Osterloh IH. Overall cardiovascular profile of sildenafil citrate. *Am J Cardiol.* 1999;83(5A):35C-44C.
27. Chrysant SG, Chrysant GS. The pleiotropic effects of phosphodiesterase 5 inhibitors on function and safety in patients with cardiovascular disease and hypertension. *J Clin Hypertens* 2012;14(9):644-9.
28. Lue TF. Erectile dysfunction. *N Engl J Med.* 2000;342(24):1802-13.
29. Pinheiro AC, Costa WS, Cardoso LE, Sampaio FJ. Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. *J Urol.* 2000;164(5):1802-6.
30. Goldstein AM, Meehan JP, Zakhary R, Buckley PA, Rogers FA. New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. *Urology.* 1982;20(3):259-66.
31. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963;27:282-93.
32. Pinto YM, Paul M, Ganen D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res.* 1998;39(1):77-88.
33. Toblli JE, Stella I, de Cavanagh EMV, Ferder L, Mazza O, Inserra F. Effects of losartan on cavernous tissue in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension.* 2002;15(4, Supplement 1):A210-A.
34. Jiang R, Chen JH, Jin J, Shen W, Li QM. Ultrastructural comparison of penile cavernous tissue between hypertensive and normotensive rats. *International Journal of Impotence Research.* 2005;17(5):417-23.
35. Toblli JE, Stella I, Inserra F, Ferder L, Zeller F, Mazza ON. Morphological changes in cavernous tissue in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2000;13(6 Pt 1):686-92.
36. Behr-Roussel D, Chamiot-Clerc P, Bernabe J, Mevel K, Alexandre L, Safar ME, et al. Erectile dysfunction in spontaneously hypertensive rats: pathophysiological mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284(3):R682-8.
37. Hale TM, Okabe H, Heaton JP, Adams MA. Antihypertensive drugs induce structural remodeling of the penile vasculature. *J Urol.* 2001;166(2):739-45.

38. Ozden E, Ozturk B, Kosan M, Tezel GG, Aki FT, Gur S, et al. Effect of sildenafil citrate on penile weight and physiology of cavernous smooth muscle in a post-radical prostatectomy model of erectile dysfunction in rats. *Urology*. 2011;77(3):761 e1-7.
39. Flisinski M, Brymora A, Elminowska-Wenda G, Bogucka J, Walasik K, Stefanska A, et al. Morphometric analysis of muscle fibre types in rat locomotor and postural skeletal muscles in different stages of chronic kidney disease. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2014;65(4):567-76.
40. Kundalic B, Ugrenovic S, Jovanovic I, Stefanovic N, Petrovic V, Kundalic J, et al. Morphometric analysis of connective tissue sheaths of sural nerve in diabetic and nondiabetic patients. *BioMed research international*. 2014;2014:870930.
41. Anderson HR, Stitt AW, Gardiner TA, Archer DB. Estimation of the surface area and volume of the retinal capillary basement membrane using the stereologic method of vertical sections. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*. 1994;16(4):253-60.
42. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2003;75(4):469-86.
43. De Souza DB, Silva D, Cortez CM, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J Androl*. 2012;33(4):735-9.
44. Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc-Oxford*. 1986;142(Pt 3):259-76.
45. Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol*. 1990;258(4 Pt 1):L148-56.
46. Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Giorgetti B, Grossi Y, Balietti M, Casoli T, et al. Alterations of synaptic turnover rate in aging may trigger senile plaque formation and neurodegeneration. *Ann NY Acad Sci*. 2007;1096:128-37.
47. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005;365(9455):217-23.
48. Toblli JE, Cao G, Lombrana A, Rivero M. Functional and morphological improvement in erectile tissue of hypertensive rats by long-term combined therapy with phosphodiesterase type 5 inhibitor and losartan. *J Sex Med*. 2007;4(5):1291-303.
49. Saito M, Ohmasa F, Dimitriadis F, Tsounapi P, Sejima T, Shimizu S, et al. Hydroxyfasudil ameliorates penile dysfunction in the male spontaneously hypertensive rat. *Pharmacol Res*. 2012;66(4):325-31.

50. Heijnen BF, Van Essen H, Schalkwijk CG, Janssen BJ, Struijker-Boudier HA. Renal inflammatory markers during the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2014;37(2):100-9.
51. Toblli JE, Cao G, Casas G, Mazza ON. In vivo and in vitro effects of nebivolol on penile structures in hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2006;19(12):1226-32.
52. El-Sakka AI, Yassin AA. Amelioration of penile fibrosis: myth or reality. *J Androl.* 2012;31(4):324-35.
53. Miranda AF, Gallo CB, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of castration and late hormonal replacement in the structure of rat corpora cavernosa. *J Androl.* 2012;33(6):1224-32.
54. Chobanian AV. 1989 Corcoran lecture: adaptive and maladaptive responses of the arterial wall to hypertension. *Hypertension.* 1990;15(6 Pt 2):666-74.
55. Vignozzi L, Filippi S, Morelli A, Ambrosini S, Luconi M, Vannelli GB, et al. Effect of chronic tadalafil administration on penile hypoxia induced by cavernous neurotomy in the rat. *J Sex Med.* 2006;3(3):419-31.
56. Ferrini MG, Davila HH, Kovanecz I, Sanchez SP, Gonzalez-Cadavid NF, Rajfer J. Vardenafil prevents fibrosis and loss of corporal smooth muscle that occurs after bilateral cavernosal nerve resection in the rat. *Urology.* 2006;68(2):429-35.
57. Ferrini MG, Kovanecz I, Sanchez S, Vernet D, Davila HH, Rajfer J, et al. Long-term continuous treatment with sildenafil ameliorates aging-related erectile dysfunction and the underlying corporal fibrosis in the rat. *Biol Reprod.* 2007;76(5):915-23.
58. Hannan JL, Blaser MC, Pang JJ, Adams SM, Pang SC, Adams MA. Impact of hypertension, aging, and antihypertensive treatment on the morphology of the pudendal artery. *J Sex Med.* 2011;8(4):1027-38.
59. Martin Morales A, Hatzichristou D, Ramon Llados J, Pascual Renedo V, Pimenidou A. Community pharmacy detection of erectile dysfunction in men with risk factors or who seek treatment or advice but lack a valid prescription. *J Sex Med.* 2013;10(9):2303-11.
60. Zhang K, Yu W, He ZJ, Jin J. Help-seeking behavior for erectile dysfunction: a clinic-based survey in China. *Asian J Androl.* 2014;16(1):131-5.
61. Gunduz MI, Gumus BH, Sekuri C. Relationship between metabolic syndrome and erectile dysfunction. *Asian J Androl.* 2004;6(4):355-8.



---

**Diogo Benchimol de Souza**

**De:** onbehalfof+jsm+issm.info@manuscriptcentral.com em nome de jsm@issm.info  
**Enviado em:** segunda-feira, 8 de setembro de 2014 12:41  
**Para:** diogobenchimol@gmail.com  
**Assunto:** URGENT need forms for your JSM accepted paper  
**Anexos:** \_ JSM-Author-Declaration-Form.pdf

08-Sep-2014

JSM-06-2014-356.R1 - Penile histomorphometrical evaluation in hypertensive rats treated with sildenafil or enalapril alone or in combination: A comparison with normotensive and untreated hypertensive rats

Dear Dr. De Souza:

It is a pleasure to accept your above-referenced manuscript.

Your manuscript is now ready to be sent to the publisher to begin production work. Before we can send the manuscript we MUST receive a copy of the attached Author Declaration Form.

I must receive the Author Declaration Form from you very shortly. Until then, your manuscript will not be sent to the publisher, as legally they cannot work on your manuscript until in receipt of the form. This will result in a delay in the publication of your manuscript.

Please either fax the form to (+1) 508-242-1184 or equally I can receive a scanned copy of the signed form.

I look forward to hearing from you very shortly.

With kind regards,

Donna Schena  
Assistant Managing Editor,  
Journal of Sexual Medicine

**Penile histomorphometrical evaluation in hypertensive rats  
treated with sildenafil or enalapril alone or in combination:  
A comparison with normotensive and untreated  
hypertensive rats**

Journal:	<i>Journal of Sexual Medicine</i>
Manuscript ID:	JSM-06-2014-356.R1
Wiley - Manuscript type:	Original Research
Subject Area:	Anatomy (gross and microscopic) < BASIC SCIENCE < BOTH GENDERS, Animal models < BASIC SCIENCE < BOTH GENDERS
Keywords:	erectile dysfunction, hypertension, morphology, penis

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4     **Penile histomorphometrical evaluation in hypertensive rats treated with sildenafil**  
5  
6     **or enalapril alone or in combination: A comparison with normotensive and**  
7  
8         **untreated hypertensive rats**  
9  
10  
11  
12  
13  
14

15     Running title: Penile of hypertensive rats treated or not  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Word count: 3,260

Number of references: 39

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
602  
70

## Abstract

Introduction: Erectile dysfunction (ED) is frequently associated to hypertension and anti-hypertensive drugs, however the penile morphological aspects on these situations are poorly known.

Aim: Evaluate the penile morphology of untreated hypertensive rats and rats treated with enalapril or sildenafil alone or in combination, to verify the hypothesis that morphological alterations promoted by hypertension on corpus cavernosum could be ameliorated by the use of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and/or phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitors.

Methods: Fifty male rats were assigned into 5 groups: normotensive rats, untreated spontaneously hypertensive rats (SHR), and SHR treated with enalapril or sildenafil alone or in combination. Blood pressure was measured weekly. At the conclusion of the study, the rats were euthanized and their penises were collected for histomorphometrical analysis.

Main outcome measures: The cross-sectional areas of the penis, tunica albuginea, and corpus cavernosum were measured. The density of the corpus cavernosum structures was quantified.

Results: Both groups of SHR rats treated with enalapril became normotensive. Untreated SHR showed no difference in penile and cavernosal cross-sectional area compared to normotensive rats; however, those rats treated with enalapril or sildenafil alone demonstrated an increase in these parameters. Rats receiving combination therapy showed no cross-sectional area differences compared to normotensive rats. Cavernosal connective tissue density was increased while the sinusoidal spaces were diminished in untreated SHR. All treatments were effective in maintaining connective tissue density in comparison to normotensive animals. Cavernosal smooth muscle density was similar in

1  
2  
3  
4 all groups, with the exception of the combination therapy group, which demonstrated a  
5 reduction in smooth muscle.  
6  
7  
8 Conclusion: Hypertension promoted structural alterations in the corpus cavernosum that  
9 may be related to ED. Enalapril and sildenafil treated animals had preservation of  
10 normal corpus cavernosum structure and an increase in penile and cavernosal cross-  
11 sectional area. The combination of these drugs showed less benefit than individual use.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Keywords:** Erectile dysfunction, hypertension, morphology, penis

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

72

## Introduction

The persistent inability to reach or maintain penile rigidity enough for sexual intercourse, known as erectile dysfunction (ED), is the most common sexual complaint of men presenting to their physicians, with a worldwide prevalence of 10–20% [1, 2]. Systemic hypertension and ED are closely intertwined diseases. Hypertension is the most commonly reported co-morbidity in patients with ED. Also, ED affects as many as 68% of hypertensive men [3]. In both diseases, endothelial factors are involved, resulting in an increased smooth muscle contraction, which leads to increased vascular pressure, poor cavernosal perfusion, and inadequate intumescence [4].

In addition to this similar pathophysiology, the use of anti-hypertensive agents has been thought to impair normal penile erection [5]. However, evidence suggests that only certain diuretics and beta-blockers may adversely influence erectile function. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, angiotensin receptor blockers, and calcium channel blockers have been reported to have no negative effects, and, on the contrary, may possibly have positive effects on erectile function [6]. ACE inhibitors have been shown to not impair erectile function in rats [7] and may improve sexual function in humans [8].

Phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitors are widely used as first-line therapy for ED in normotensive and hypertensive men. Since PDE5 inhibitors act by promoting smooth muscle relaxation, it has been suggested that they could ameliorate elevated arterial blood pressure by relaxing vascular smooth muscle in a manner similar to their action on corpus cavernosum smooth muscle. Some authors have shown that daily usage of PDE5 inhibitors may be beneficial in antihypertensive therapy [9, 10].

1  
2  
3  
4 Although ED may be of multiple causes [11], the structure of the corpus  
5 cavernosum is thought to play a key role in the mechanism of erection [12]. The  
6 parenchyma of the corpus cavernosum is mainly composed by collagen fibers  
7 supporting smooth-muscle cells that surround the sinusoidal spaces. These spaces are  
8 filled by blood leading to penile elongation and rigidity during erection [13]. Normal  
9 proportions of these structures are required for developing and maintaining erection, and  
10 altered proportions may be related to ED [12].  
11  
12

13 The spontaneously hypertensive rat (SHR) strain was obtained by inbreeding of  
14 Wistar Kyoto rats with elevated blood pressure [14]. In these rats, blood pressure  
15 continuously increases from the fifth to the fifteenth week of life, when it stabilizes in  
16 values higher than 200 mmHg. SHR animals presents vascular alterations and thus has  
17 been the main animal model used to study hypertension and other cardiovascular  
18 associated diseases, including erectile dysfunction [15]. The penis of these animals  
19 showed structural and ultrastructural alterations, with sinusoidal collagen increase and  
20 vascular wall modifications [16].  
21  
22

23 Although the morphology of the corpus cavernosum was shown to be altered by  
24 hypertension in the SHR model, with impairment of erectile function in these animals  
25 [16-18], it is not known if these morphological alterations can be prevented or reversed  
26 with the use of enalapril (an ACE inhibitor), sildenafil (a PDE5 inhibitor), or a  
27 combination of both medications. The hypothesis of this study was that morphological  
28 alterations on corpus cavernosum, promoted by hypertension, could be ameliorated by  
29 the use of ACE inhibitors and/or PDE5 inhibitors. Thus, the objective of this study was  
30 to compare, in an animal model, the penile morphology of normotensive rats, untreated  
31 SHR, SHR treated with enalapril or sildenafil alone, and SHR treated with these 2 drugs  
32 in combination.  
33  
34

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

6  
74

For Peer Review

#### Material and methods

**Experimental design**

Fifty 120-day-old male rats ( $n = 40$  SHR and  $n = 10$  Wistar Kyoto) were used in this experiment. The rats were maintained in an animal facility room at a temperature of  $21 \pm 1$  °C, with a controlled 12-hour light/dark cycle (artificial light, 7:00 AM to 7:00 PM). The rats received commercial food and water *ad libitum*. All procedures were carried out in conformity with the conventional guidelines on animal experimentation. The experimental protocols were approved by the Institutional animal experimentation ethics committee (protocol no. CEUA/051/2012).

The rats were divided into 5 groups of 10 animals each: (1) WKY group, composed of normotensive Wistar Kyoto rats; (2) H group, composed of SHR; (3) HE group, composed of SHR treated with enalapril; (4) HS group, composed of SHR animals treated with sildenafil; and (5) HES group, composed of SHR treated with enalapril and sildenafil.

All drugs were administered orally for 40 days. Groups HE and HES received 30 mg/kg/day of enalapril (Primordium, Rio de Janeiro, Brazil) [7, 19] and groups HS and HES received 1 mg/kg/day of sildenafil (Primordium, Rio de Janeiro, Brazil) [20]. The drugs were diluted so that each animal received 2 ml/day by gavage. The animals of groups WKY and H received 2 ml/day of saline by gavage during the treatment period.

#### Blood pressure measurement

The blood pressure measurement was used to confirm the hypertensive model and to measure the effect of the drugs on this parameter. The systolic arterial pressure was measured by tail-cuff plethysmography (Insight, São Paulo, Brazil) weekly,

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

76

beginning at 90 days of age, so that by the beginning of the experiment, at age 120 days, the animals were adapted to the procedure. The mean of 3 consecutive measurements was used for calculation of each animal's blood pressure.

### Euthanasia and histological procedures

At age 160 days, the rats were euthanized with an anesthetic overdose and their penises were dissected and fixed in 4% buffered formalin. Considering a distal bone present in the rat penis, the mid-shaft of each organ was used for the morphological analyses. This tissue was processed for paraffin embedding and prepared in 5- $\mu$ m thick sections, which were stained with picrosirius red or Masson's trichrome.

Immunolabeling was also performed with the primary antibody anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA, Product code 13-3900, Invitrogen, Camarillo, USA), diluted to 1:100.

Morphological analyses were carried out with photomicrographs, captured with a digital camera (DP70, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan).

### Morphometric analyses

The penis of each animal was examined visually through x20 images of cross-sections stained with picrosirius red. In these bright field captured images, the areas of the penis, corpus cavernosum including its tunica albuginea, and the corpus cavernosum without the tunica albuginea were measured in mm<sup>2</sup> using the Image J software (version 1.45s, National Institutes of Health, Bethesda, USA) with the "Free Hand" tool after calibration with a micrometric ruler. The area of the tunica albuginea was estimated by

1  
2  
3  
4 the difference in the areas of the corpus cavernosum with and without the tunica  
5 albuginea.  
6  
7

8 The surface densities (Sv) of the connective tissue, sinusoidal space, and smooth  
9 muscle of the corpus cavernosum were measured by examining cross-sections stained  
10 with Masson's trichrome. For each animal, 25 photomicrographs of the corpus  
11 cavernosum were obtained under x200 magnification. The density of each of these  
12 structures was expressed as a percentage, obtained by the point-counting method [21].  
13 Briefly, a 100 point grid was superimposed over the images using the "grid" tool of  
14 Image J software and each structure touched by one point were counted as connective  
15 tissue, sinusoidal space, smooth muscle, or other structure. The "cell counter" tool of  
16 Image J software was used for counting separately each structure.  
17  
18

19 The cell proliferation rate of each corpus cavernosum was quantified by the  
20 number of cells in proliferation per mm<sup>2</sup>. For this, slides that had been immunolabeled  
21 with the anti-PCNA antibody were used. The images were captured at x600  
22 magnification and the number of immunolabeled nuclei was counted with the aid of the  
23 "cell counter" tool of the Image J software. The area of the analyzed field was measured  
24 with the "measure" tool, after calibration of the software with a micrometric ruler  
25 photomicrography.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

#### 46 Statistical analyses

47 For each parameter, the means of H, HE, HS and HES were compared to WKY;  
48 and the means of HE, HS and HES were compared to H. The results were first analyzed  
49 by the Kolmogorov-Smirnov normality test. Parametric data were then compared by  
50 one-way ANOVA with Bonferroni's post-test while nonparametric data were compared  
51 by the Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test. For all analysis two tailed tests were  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

10

78

1  
2  
3  
4 used. All analyses were performed with the GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad  
5 Software, San Diego, USA). Mean differences were considered significant when  $p <$   
6  
7 0.05. All results are presented as mean  $\pm$  standard deviation.  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

**Results****Blood pressure**

At the initiation of the experiment, all animals of the SHR strain (H, HE, HS, and HES groups) had blood pressures  $>204$  mmHg, which was statistically higher than in the Wistar Kyoto animals ( $155.7 \pm 20.0$ ;  $p<0.0001$ ), thereby confirming the validity of the experimental model.

At the conclusion of the study, the rats that received enalapril (HE and HES groups) had blood pressures similar to that of the WKY group. The animals of the H and HS groups remained hypertensive. The blood pressure data are reported in Table 1.

**Penile cross-sectional area**

There was no difference in the penis cross-sectional diameter in the hypertensive (H) animals in comparison with the normotensive animals (WKY). However, the animals treated with enalapril (HE) and with sildenafil (HS) had increases in the cross-sectional area of 9% and 17%, respectively, while rats receiving the combination of these drugs (HES) demonstrated no change in penile cross-sectional area.

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

The cross-sectional area of the corpus cavernosum with and without the tunica albuginea was similar in the WKY and H groups. The area of the corpus cavernosum without the tunica albuginea was 13% larger in the rats that received enalapril (HE group) when compared to the WKY group. The corpus cavernosum with and without the tunica albuginea in the sildenafil treated group (HS group) increased by 12% and 10%, respectively, in comparison to the WKY group. The combination therapy group

12

80

(HES group) showed no change in the cross-sectional area of the corpus cavernosum with and without the tunica albuginea in comparison to the normotensive WKY group.

### Tunica albuginea cross-sectional area

The cross-sectional area of the tunica albuginea was similar in the H group and the WKY groups. The rats in the HE, HS, and HES groups did not show any significant changes in the cross-sectional area of the tunica albuginea in comparison with the WKY group. However, the HS group showed a 21% increase in the tunica albuginea cross-sectional area when compared with the H group.

### Connective tissue density of the corpus cavernosum

When analyzing the connective tissue by point-counting planimetry, we observed a 13% increase in connective tissue density in the H group in comparison with WKY group. The HE, HS, and HES groups showed connective tissue density values similar to that of the WKY group (Figure 1).

### Sinusoidal space density of the corpus cavernosum

The analysis of the density of sinusoidal space showed a 33% reduction in group H in comparison to the WKY group, while the density of the treated groups (HE, HS and HES) was equal to that of the WKY group (Figure 1).

### Smooth muscle density of the corpus cavernosum

The density of smooth muscle in the corpus cavernosum was 23% less in the HES group in comparison to the WKY group. Groups H, HE, and HS showed densities similar to the WKY group.

### Cell proliferation

PCNA immunohistochemical staining showed a 50% greater positive cells in the H group, while values in the HE, HS, and HES groups were similar in comparison to the WKY group. All morphological results are presented in Table 2.

14

82

## Discussion

Arterial hypertension is a worldwide public health condition that affects more than one quarter of the adult population [22]. Several diseases have been associated with hypertension including ED. In both of these diseases, endothelial dysfunction plays an important role, impairing adequate smooth muscle relaxation for the control of arterial blood pressure or for the promotion of cavernous intumescence [4].

SHRs are an animal model commonly used for studies of hypertension, including studies focusing on ED [23-25]. In the SHR model it has been shown that hypertension induces morphological alterations in the corpus cavernosum with increases in both collagen and smooth muscle [18, 26]. Although, an increase in smooth muscle was not observed in our study, trabecular connective tissue, composed primarily of collagen, was increased in the hypertensive rats.

An increased amount of cavernosal connective tissue is highly associated with penile fibrosis and is commonly observed in patients with ED [27]. Penile fibrosis has also been related to aging, diabetes mellitus, cavernous nerve damage, chronic stress, and androgen deprivation [21, 27].

Previous studies reporting increased smooth muscle content analyzed the long-term effects of hypertension on SHR corpora cavernosa [18, 26]. In distinction from our study, in which the animals were killed at 5 months of age, these studies evaluated the penile histology of 8-month-old rats. Thus, it may be the case that increases in smooth muscle content develop more slowly than increases in other connective tissue components.

Hypertension has been showed to produce important alteration in cavernosal vasculature. Previous studies pointed that the vascular smooth muscle of corpora

cavernosa is augmented in response to hypertension [16]. Also, hypertension leads to endothelial abnormalities by shear stress which culminates in an altered production of vasoactive substances, enhanced endothelial proliferation, and intimal permeability. These alterations can be a cause of cavernosal hypoxia which has been pointed as a cause of ED.

A low cavernosal oxygen tension is known to stimulate the expression of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) and inhibits the prostaglandin E synthesis [28]. In cell culture studies, TGF $\beta$ 1 was shown to increase by 2 to 4 folds the synthesis of collagen. Also, prostaglandin E seems to be responsible to suppress the TGF $\beta$ 1 induced collagen synthesis [29]. Thus, the penile fibrosis seen on hypertensive rats in previous and in the present study, could be a consequence of PGF $\beta$ 1 increase resulting from the hypoxia.

Most importantly, these alterations was prevented or reversed by the therapies proposed. Antihypertensive therapy was shown to reverse or prevent the hypertensive vascular alterations as they maintain blood pressure in normal range [30]. Also, PDE5 inhibitors are thought to increase penile oxygen tension by acting in smooth muscle relaxation, also augmenting the penile blood flow [31]. These could be possible explanations for the good results found on treated groups of our study.

The amount of PCNA positive cells in the corpora cavernosa of hypertensive animals was much higher than that seen in controls. Although these proliferating cells were not classified, one can suppose that fibroblasts, the most common cells in the rat corpora cavernosa, are involved in this process [32]. This would be consistent with the fibrosis observed in these animals. Most importantly, this parameter was not elevated in the treatment groups.

16

84

As reported by previous groups, cavernosal morphology and function are closely related, and any structural alteration may lead to, or be a consequence of ED [12, 13, 21]. In the SHR model, hypertension has been related to impaired penile erection, as measured by intracavernosal pressure [17]. This finding confirms that an important relationship exists between penile morphology and function in the SHR model, as well as in other ED models. Therefore, cavernosal morphological studies in the SHR model are thought to be of interest for understanding erectile function in hypertension.

In the present study, the reduction in sinusoidal space density found in hypertensive animals may be a consequence of decreased intracavernosal pressure, as previously reported in SHR [17]. In this case, the sinusoids may be unable to compress the deep circumflex veins against the tunica albuginea, resulting in venous leak and low intracavernosal pressure [33].

All of the treated groups demonstrated normal sinusoidal space density, indicating that blood pressure control or improved smooth muscle relaxation, promoted by sildenafil, allowed the maintenance of adequate intracavernosal pressure. Treatment also appears to have prevented changes in trabecular connective tissues. The group that received only enalapril (HE) showed no evidence of penile fibrosis while the groups receiving sildenafil (HS and HES) demonstrated results that can be considered as intermediate to that of the normotensive and untreated hypertensive rats, as no statistically differences were found in these comparisons. With regard to smooth muscle content, the group that received both drugs (HES) had poor results in comparison to the other groups. In this case, it seems that the drugs may have had antagonistic effects. It has been previously shown that sildenafil and vardenafil prevents fibrosis and maintains normal smooth muscle content in 2 different rat models of ED [34, 35]. Further investigations as to why sildenafil, alone or in combination with enalapril, was not as

1  
2  
3 effective in SHR rats as compared to results in other models are necessary.  
4  
5 Nevertheless, the groups that received the PDE5 inhibitor (HS and HES) demonstrated  
6  
7 more closely normal cavernosal morphology than hypertensive animals without  
8  
9 medication.

10  
11 We observed that both penile and cavernosal cross-sectional areas were  
12 increased in both the enalapril (HE) and sildenafil (HS) treated groups. This is thought  
13 to be a positive effect of these drugs. Improved perfusion of the corpora cavernosa in  
14 these groups, as demonstrated by the increased sinusoidal space density, may be the  
15 basis of this increase. Interestingly, the group that received combination therapy did not  
16 show this benefit, possibly again reflecting an antagonistic effect of these drugs. Further  
17 studies investigating the action of these drugs used in combination would be of interest.  
18  
19 It is important to remember that sildenafil was used daily in our study. The on-demand  
20 use of sildenafil, alone or in combination with enalapril, may not have the same effects  
21 as seen in our study.

22  
23 Overall, it appears that hypertension promotes morphological alterations in the  
24 corpus cavernosum as has been reported previously [16-18, 26, 36]. Enalapril, by  
25 reducing blood pressure, was able to prevent these alterations. Based on our findings,  
26 enalapril, or other ACE inhibitors, may be desirable options for treating hypertensive  
27 patients with some degree of ED that would not need PDE5 inhibitors. This is also in  
28 accordance to the literature that points ACE inhibitors as good options for the patients  
29 with ED in whom PDE5 inhibitor therapy is not indicated [5].

30  
31 The use of PDE5 inhibitors to treat hypertensive patients is not recommended.  
32 However, the use of sildenafil in otherwise untreated hypertensive patients justifies  
33 interest in this group [37, 38]. In our study, sildenafil maintained the morphology of the  
34 corpora cavernosa in SHR, despite the persistence of high blood pressure.

18

86

Some limitation of the study should be pointed. Since the penises of rats and humans are structurally different, the use of an animal model in this study may be considered a limitation. However, both species have the same structural components and it appears that these components respond in a similar way when exposed to different experimental conditions [21, 32]. Additionally, ED is commonly multifactorial, involving conditions besides hypertension, such as age, obesity, and hypogonadism [5, 39]. In the SHR model, hypertension was a primary and isolated disease that does not correspond to the typical clinical setting.

Further investigation explaining the mechanisms by how the hypertension is linked to the penile alterations would be of interest. This could be important step for specific pathway blockers, with potential new drugs development. Since both ACE and PDE5 inhibitors showed beneficial effects, it is possible that there are different solutions for the same problem.

In conclusion, in our experimental model, hypertension promoted structural alterations in the corpora cavernosa that may be related to ED. Based on our morphological findings, enalapril would represent a desirable option for the treatment of hypertension in patients in whom erectile function is a concern. Sildenafil in continuous use maintained normal corpus cavernosum structure, and prevented those changes observed in untreated hypertensive rats. The use of these drugs individually resulted in an improvement in penile morphology. However, the combination of these drugs was not as beneficial as was individual usage.

1  
2  
3  
4 **Take Home Messages**  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Hypertension causes cavernosal morphologic modifications that may be one important link of this disease with ED. When treating hypertensive patients with ED, the use of ACE inhibitors would be a good choice. The over-the-count continuous use of sildenafil by untreated hypertensive individuals may be beneficial against the cavernosal modifications. Continuous use of sildenafil by enalapril treated individuals may be as not benefit as its single usage, when looking at penile morphology.

26 **Conflicts of interest**  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

The authors have no conflicts of interest or financial interests to disclose.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
6020  
88

## References

- 1 NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on  
2 Impotence. JAMA 1993;270:83-90.
- 3 Albersen M, Mwamukonda KB, Shindel AW, Lue TF. Evaluation and treatment  
4 of erectile dysfunction. Med Clin North Am 2011;95:201-12.
- 5 Burchardt M, Burchardt T, Baer L, Kiss AJ, Pawar RV, Shabsigh A, de la Taille  
6 A, Hayek OR, Shabsigh R. Hypertension is associated with severe erectile  
7 dysfunction. J Urol 2000;164:1188-91.
- 8 Nunes KP, Labazi H, Webb RC. New insights into hypertension-associated  
9 erectile dysfunction. Curr Opin Nephrol Hypertens 2012;21:163-70.
- 10 Javaroni V, Neves MF. Erectile dysfunction and hypertension: impact on  
11 cardiovascular risk and treatment. Int J Hypertens 2012;2012:627278.
- 12 Baumhäkel M, Schlimmer N, Kratz M, Hackett G, Hackett G, Jackson G, Böhm  
13 M. Cardiovascular risk, drugs and erectile function - a systematic analysis. Int J  
14 Clin Pract 2011;65:289-98.
- 15 Hale TM, Okabe H, Bushfield TL, Heaton JP, Adams MA. Recovery of erectile  
16 function after brief aggressive antihypertensive therapy. J Urol 2002;168:348-54.
- 17 Gratzke C, Angulo J, Chitaley K, Dai YT, Kim NN, Paick JS, Simonsen U U,  
18 Ückert S, Wespes E, Andersson KE, Lue TF, Stief CG. Anatomy, physiology,  
19 and pathophysiology of erectile dysfunction. J Sex Med 2010;7:445-75.
- 20 Zusman RM, Morales A, Glasser DB, Osterloh IH. Overall cardiovascular  
21 profile of sildenafil citrate. Am J Cardiol 1999;83:35C-44C.

- 1  
2  
3  
4 10 Chrysant SG, Chrysant GS. The pleiotropic effects of phosphodiesterase 5  
5 inhibitors on function and safety in patients with cardiovascular disease and  
6 hypertension. *J Clin Hypertens* 2012;14:644-9.  
7  
8  
9  
10 11 Lue TF. Erectile dysfunction. *N Engl J Med* 2000;342:1802-13.  
11  
12 12 Costa WS, Carrerete FB, Horta WG, Sampaio FJ. Comparative analysis of the  
13 penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU*  
14 Int 2006;97:567-9.  
15  
16 13 Goldstein AM, Meehan JP, Zakhary R, Buckley PA, Rogers FA. New  
17 observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible  
18 relationship to mechanism of erection. *Urology* 1982;20:259-66.  
19  
20 14 Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive  
21 rats. *Jpn Circ J* 1963;27:282-93.  
22  
23 15 Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from  
24 Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res* 1998;39:77-88.  
25  
26 16 Jiang R, Chen JH, Jin J, Shen W, Li QM. Ultrastructural comparison of penile  
27 cavernous tissue between hypertensive and normotensive rats. *International*  
28 *Journal of Impotence Research* 2005;17:417-23.  
29  
30 17 Behr-Roussel D, Chamiot-Clerc P, Bernabe J, Mevel K, Alexandre L, Safar ME,  
31 Giuliano F. Erectile dysfunction in spontaneously hypertensive rats:  
32 pathophysiological mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*  
33 2003;284:R682-8.  
34  
35 18 Toblli JE, Stella I, Inserra F, Ferder L, Zeller F, Mazza ON. Morphological  
36 changes in cavernous tissue in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*  
37 2000;13:686-92.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
6022  
90

- 19 Hale TM, Okabe H, Heaton JP, Adams MA. Antihypertensive drugs induce structural remodeling of the penile vasculature. *J Urol* 2001;166:739-45.
- 20 Ozden E, Ozturk B, Kosan M, Tezel GG, Aki FT, Gur S, Ergen A, Ozen H. Effect of sildenafil citrate on penile weight and physiology of cavernous smooth muscle in a post-radical prostatectomy model of erectile dysfunction in rats. *Urology* 2011;77:761 e1-7.
- 21 De Souza DB, Silva D, Cortez CM, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J Androl* 2012;33:735-9.
- 22 Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005;365:217-23.
- 23 Heijnen BF, Van Essen H, Schalkwijk CG, Janssen BJ, Struijker-Boudier HA. Renal inflammatory markers during the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2014;37:100-9.
- 24 Toblli JE, Cao G, Lombrana A, Rivero M. Functional and morphological improvement in erectile tissue of hypertensive rats by long-term combined therapy with phosphodiesterase type 5 inhibitor and losartan. *J Sex Med* 2007;4:1291-303.
- 25 Saito M, Ohmasa F, Dimitriadis F, Tsounapi P, Sejima T, Shimizu S, Kinoshita Y, Satoh K. Hydroxyfasudil ameliorates penile dysfunction in the male spontaneously hypertensive rat. *Pharmacol Res* 2012;66:325-31.
- 26 Toblli JE, Cao G, Casas G, Mazza ON. In vivo and in vitro effects of nebivolol on penile structures in hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2006;19:1226-32.
- 27 El-Sakka AI, Yassin AA. Amelioration of penile fibrosis: myth or reality. *J Androl* 2012;31:324-35.

- 1  
2  
3  
4 28 Moreland RB. Is there a role of hypoxemia in penile fibrosis: a viewpoint  
5 presented to the Society for the Study of Impotence. *Int J Impot Res*  
6 1998;10:113-20.  
7  
8  
9  
10 29 Moreland RB, Traish A, McMillin MA, Smith B, Goldstein I, Saenz de Tejada I.  
11 PGE1 suppresses the induction of collagen synthesis by transforming growth  
12 factor-beta 1 in human corpus cavernosum smooth muscle. *J Urol* 1995;153:826-  
13 34.  
14  
15 30 Chobanian AV. 1989 Corcoran lecture: adaptive and maladaptive responses of  
16 the arterial wall to hypertension. *Hypertension* 1990;15:666-74.  
17  
18  
19 31 Vignozzi L, Filippi S, Morelli A, Ambrosini S, Luconi M, Vannelli GB, Donati  
20 S, Crescioli C, Zhang XH, Mirone V, Forti G, Maggi M. Effect of chronic  
21 tadalafil administration on penile hypoxia induced by cavernous neurotomy in  
22 the rat. *J Sex Med* 2006;3:419-31.  
23  
24 32 Pinheiro AC, Costa WS, Cardoso LE, Sampaio FJ. Organization and relative  
25 content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus  
26 cavernosum of rat penis. *J Urol* 2000;164:1802-6.  
27  
28 33 Miranda AF, Gallo CB, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of  
29 castration and late hormonal replacement in the structure of rat corpora  
30 cavernosa. *J Androl* 2012;33:1224-32.  
31  
32 34 Ferrini MG, Davila HH, Kovanecz I, Sanchez SP, Gonzalez-Cadavid NF, Rajfer  
33 J. Vardenafil prevents fibrosis and loss of corporal smooth muscle that occurs  
34 after bilateral cavernosal nerve resection in the rat. *Urology* 2006;68:429-35.  
35  
36 35 Ferrini MG, Kovanecz I, Sanchez S, Vernet D, Davila HH, Rajfer J, Gonzalez-  
37 Cadavid NF. Long-term continuous treatment with sildenafil ameliorates aging-  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 related erectile dysfunction and the underlying corporal fibrosis in the rat. Biol  
5 Reprod 2007;76:915-23.  
6  
7  
8 36 Hannan JL, Blaser MC, Pang JJ, Adams SM, Pang SC, Adams MA. Impact of  
9 hypertension, aging, and antihypertensive treatment on the morphology of the  
10 pudendal artery. J Sex Med 2011;8:1027-38.  
11  
12  
13 37 Zhang K, Yu W, He ZJ, Jin J. Help-seeking behavior for erectile dysfunction: a  
14 clinic-based survey in China. Asian J Androl 2014;16:131-5.  
15  
16  
17 38 Martin Morales A, Hatzichristou D, Ramon Llados J, Pascual Renedo V,  
18 Pimenidou A. Community pharmacy detection of erectile dysfunction in men  
19 with risk factors or who seek treatment or advice but lack a valid prescription. J  
20 Sex Med 2013;10:2303-11.  
21  
22  
23  
24 39 Gunduz MI, Gumus BH, Sekuri C. Relationship between metabolic syndrome  
25 and erectile dysfunction. Asian J Androl 2004;6:355-8.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6

93

7           **Table 1:** Blood pressure measurements at 120 days (initiation of treatment) and 160 days of age (conclusion of treatment). Data from  
8           normotensive rats (WKY), untreated hypertensive rats (H), and hypertensive rats receiving enalapril (HE), sildenafil (HS), or a combination of  
9           enalapril and sildenafil (HES)

	WKY	H	HE	HS	HES	p value
<b>Initial blood pressure (mmHg)</b>	155.7 ± 20.0	239.2 ± 33.1*	237.7 ± 12.5*	254.1 ± 37.0*	234.4 ± 12.0*	<0.0001
<b>Final blood pressure (mmHg)</b>	153.4 ± 24.4	205.1 ± 24.8*	153.9 ± 21.0†	212.1 ± 6.5*	156.2 ± 11.5†	<0.0001

21           Data are presented as mean ± standard deviation. For each parameter, \* represents statistically difference from WKY; † represents statistically  
22           difference from H.

1  
2  
3  
4  
5 **Table 2:** Penile morphometrical data from normotensive rats (WKY), untreated hypertensive rats (H), and hypertensive rats receiving enalapril  
6 (HE), sildenafil (HS), or a combination of enalapril and sildenafil (HES)  
7  
8

94

	WKY	H	HE	HS	HES	p value
<b>Penile cross-sectional area (mm<sup>2</sup>)</b>	7.71 ± 0.8	7.63 ± 0.6	8.42 ± 0.6*†	9.08 ± 0.5*†	7.92 ± 0.8	<0.0001
<b>Corpora cavernosa area with tunica (mm<sup>2</sup>)</b>	5.19 ± 0.3	5.23 ± 0.5	5.54 ± 0.5	5.83 ± 0.4*†	5.21 ± 0.6	0.0012
<b>Corpora cavernosa area without tunica (mm<sup>2</sup>)</b>	2.71 ± 0.3	2.80 ± 0.2	3.08 ± 0.2*†	3.00 ± 0.2*	2.70 ± 0.3	<0.0001
<b>Area of the tunica albuginea (mm<sup>2</sup>)</b>	2.57 ± 0.1	2.40 ± 0.2	2.38 ± 0.2	2.9 ± 0.3†	2.478 ± 0.3	0.0124
<b>Sv of the sinusoidal space (%)</b>	25.86 ± 2.0	17.15 ± 3.3*	22.36 ± 3.7†	22.34 ± 4.5†	25.79 ± 4.5†	<0.0001
<b>Sv of connective tissue (%)</b>	59.40 ± 3.3	67.55 ± 2.7*	59.26 ± 6.4†	61.36 ± 7.0	62.69 ± 4.9	0.0013
<b>Sv of smooth muscle tissue (%)</b>	13.70 ± 2.2	14.19 ± 2.1	14.86 ± 1.7	12.87 ± 1.2	10.52 ± 1.2*†	0.0002
<b>PCNA (cells/mm<sup>2</sup>)</b>	18.03 ± 3.1	27.94 ± 3.2*	19.51 ± 4.5†	23.44 ± 2.3	17.63 ± 1.5†	0.0009

29  
30 Data are presented as mean ± standard deviation. For each parameter, \* represents statistically difference from WKY; † represents statistically  
31  
32 difference from H.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

1  
2  
3  
4  
5  
6

95

7      **Figure legend**  
8  
9  
10

11  
12      **Figure 1.** Photomicrographs of: A) normotensive rat penile corpus cavernosum (WKY), B) untreated hypertensive rats (H), C) enalapril treated  
13      hypertensive rats (HE), D) sildenafil treated hypertensive rats (HS), and E) enalapril and sildenafil treated hypertensive rats (HES).  
14  
15      Photomicrographs demonstrate a reduction of sinusoidal spaces and an increase in connective tissue in H rats in comparison to other groups  
16  
17      (WKY, HE, HS, and HES). Masson's trichrome, X200. Scale bars represent 100  $\mu$ m.  
18  
19

20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

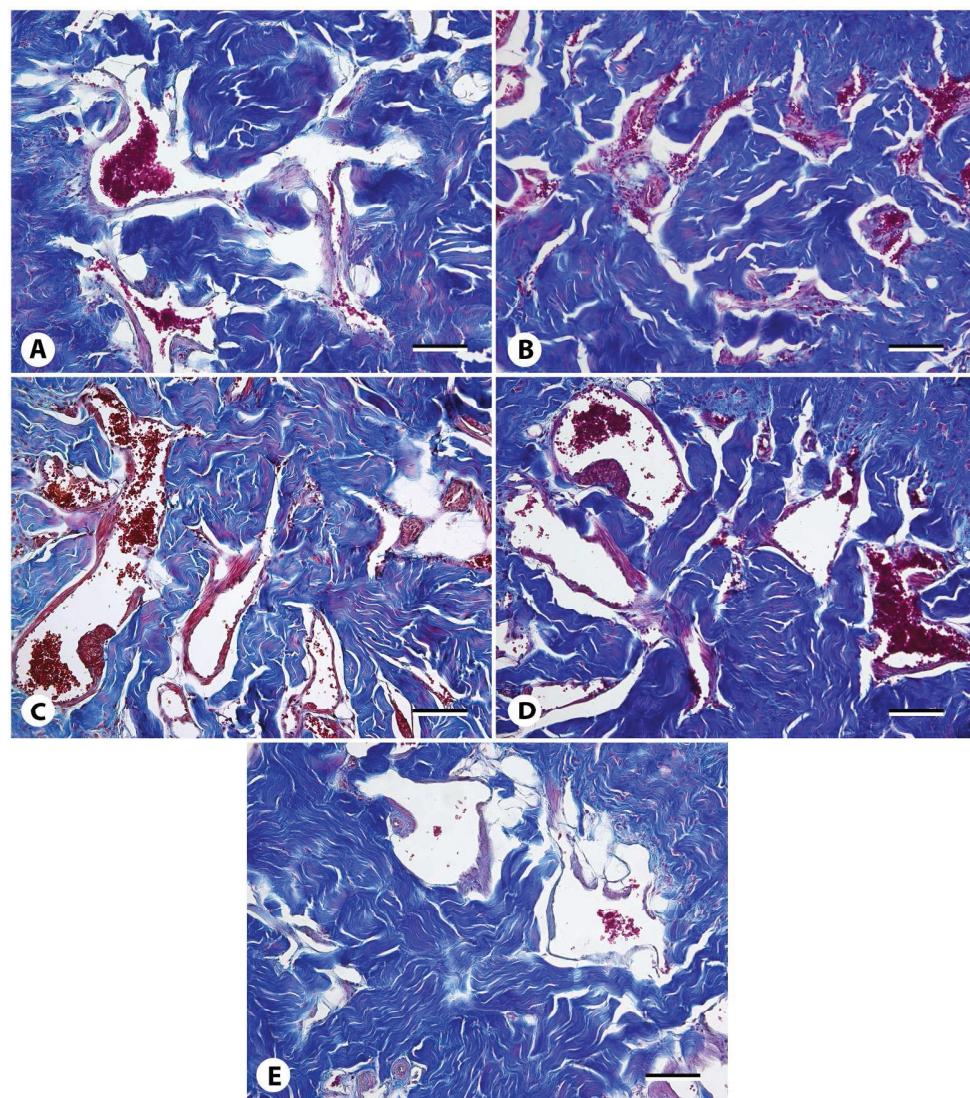


Figure 1. Photomicrographs of: A) normotensive rat penile corpus cavernosum (WKY), B) untreated hypertensive rats (H), C) enalapril treated hypertensive rats (HE), D) sildenafil treated hypertensive rats (HS), and E) enalapril and sildenafil treated hypertensive rats (HES). Photomicrographs demonstrate a reduction of sinusoidal spaces and an increase in connective tissue in H rats in comparison to other groups (WKY, HE, HS, and HES). Masson's trichrome, X200. Scale bars represent 100  $\mu$ m.  
199x226mm (300 x 300 DPI)

**Manuscript****Comparison of two methods for obtaining the surface density of biological structures**

Bruno Felix-Patrício, MSc.<sup>a,b</sup> Diogo B De Souza, PhD.<sup>a</sup> Waldemar S Costa, PhD.<sup>a</sup>

Francisco J Sampaio PhD.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro,

Blvd. 28 de Setembro, 87, Fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>b</sup> Institute for Humanities and Health, Federal Fluminense University, Rua Recife, s/n, Jardim Bela Vista, Rio das Ostras – RJ, Brazil.

This work was conducted at the Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro.

**CORRESPONDING AUTHOR:**

Diogo B. de Souza

Urogenital Research Unit – UERJ

Blvd. 28 de Setembro, 87, Fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

CEP: 20551-030

Phone: +55 21 2868-8399

E-mail: diogobenchimol@gmail.com

## ABSTRACT

The use of morphometrical tools in biomedical research permits accurate comparison of specimens submitted to different conditions. The surface density of structures are commonly used for this purpose. The traditional point-counting-method although reliable, is time consuming and computer aided methods have been proposed. The objective of the present study is to compare the results of penile corpus cavernosum smooth muscle surface density in different groups of rats, as measured by the point-counting-method or by the color-based segmentation method. 10 normotensive and 10 hypertensive male rats were used in this study. The rats' penis were processed for obtaining smooth muscle immunostained histological slices. Photomicrographs were captured from these slices and were used for the analysis. The smooth muscle surface density was measured in both normotensive and hypertensive rats by the point-counting-method and by the color-based segmentation method. The hypertensive rats presented a statistic increase of smooth muscle surface density, as measured by the two methods. However, the results on the hypertensive group were higher when measured by the point-counting-method in comparison to those obtained by the color-based segmentation method. The use of either point-counting-method or color-based segmentation method did not influences the final interpretation of the results. However, results obtained by one method should not be compared to results obtained by the other, as difference was found among them.

**KEYWORDS:** Morphometry; Quantification; Point-counting-method; Color-based segmentation method

## INTRODUCTION

The morphological alterations of cells and tissues are highly associated with functional and developmental alterations and thus, commonly the focus of scientific investigation (Perica et al., 2014). Traditionally, morphology is studied describing the normal and/or pathological findings of the organ, tissue or cell of interest.

Although the description of morphological changes is valid in some specific circumstances, for most situations, the scientific results gain value when expressed numerically (Flisinski et al., 2014; Kundalic et al., 2014). Is based on this premise that the use of morphometry for medical research supports itself. Commonly it is possible to quantify morphological changes in structures affected by disease or when subjected to medical or surgical treatments (Costa et al., 2006). Quantifying a structure, either macroscopic or microscopic, generates accuracy and gives credibility to the study, generating numerical data that can be used for statistical comparisons (Anderson et al., 1994; Mandarim-De-Lacerda, 2003).

Some scientific articles uses score quantification which is based on the interpretation of an observer. Since the result depends directly on the experience of the observer, it makes the method less reliable and reproducible. Thus, it should be preferable to use objective methods for morphometrical analysis, where the experience of the observer is a factor of little impact on the outcome of the results (Anderson et al., 1994; Mandarim-De-Lacerda, 2003).

In this way, the quantification of the surface density of structures that compose a organ, tissue or cell is often used to characterize and compare it under different situations. As for example, Bertoni-Freddari et al. (2007a) measured the synaptic surface density in different areas of the cerebral cortex of monkeys of different ages for

studying the effects of aging on the brain; and Romek et al. (2011) used this methodology to study the inner mitochondrial membrane surface density in relation to the pre-implantation development and metabolic alterations of the porcine embryo. Therefore, this method provides important information, giving basis for comparisons between groups of patients or animals subjected to different conditions.

Traditionally the point-counting-method is used for obtaining the surface density of one structure of interest. According to this method, the number of points that intercepts the structure of interest, divided by the total number of points superimposed to the field of interest represents the density of the structure. The point-counting-method is considered quite reliable, since its premises (randomization, repetition and blind measurements) are respected (Baddeley et al., 1986; Cruz-Orive and Weibel, 1990; Anderson et al., 1994; Mandarim-De-Lacerda, 2003; Bertoni-Freddari et al., 2007b). However, it brings the disadvantage of the time spent for counting the points of each analyzed image.

Thus, the quantification of structures based on the computed-counted area occupied by a certain color has been proposed (Sun et al., 2010; Liu et al., 2013; Yang et al., 2014). This method, called color-based segmentation method, needs less time for its execution by the researcher, speeding the achievement of scientific results. According to this method, the structure to be quantified must have a color distinguishable from the other structures of the image; therefore the computer can measure the percentage of area occupied by that color and consequently of the structure of interest.

Both methods are considered reliable and reproducible for the determination of the surface density. However, such methods have not been objectively compared when applied to a biological situation. By principle, the surface density of a structure,

measured by the point-counting-method or by the color-based segmentation method in the same group of individuals, should generate similar results.

The objective of the present study is to compare the results of penile corpus cavernosum smooth muscle surface density in different groups of rats, as measured by the point-counting-method or by the color-based segmentation method.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental design

Twenty 120-day-old male rats were used in this experiment. The rats were maintained in an animal facility room at a temperature of  $21 \pm 1$  °C, with a controlled 12-hour light/dark cycle (artificial light, 7:00 AM to 7:00 PM). The rats received commercial food and water *ad libitum*. All procedures were carried out in conformity with the conventional guidelines on animal experimentation. The experimental protocols were approved by the Institutional animal experimentation ethics committee (protocol no. CEUA/051/2012).

The animals were divided into two groups, each one with 10 animals: group WKY, with normotensive rats of the Wistar Kyoto strain; and group SHR with animals of the strain “spontaneously hypertensive rats”. Systolic blood pressure was measured weekly in order to confirm the experimental models used.

### Euthanasia and histological procedures

At age 160 days, the rats were euthanized with an anesthetic overdose and their penises were dissected and fixed in 4% buffered formalin. Considering a distal bone present in the rat penis, the mid-shaft of each organ was used for the morphological analyses. This tissue was processed for paraffin embedding and prepared in 5- $\mu$ m thick sections. Immunolabeling was also performed with the primary antibody anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin (Zymed Laboratories, Carlsbad, California) (Figure 1A).

All morphometrical analyses were carried out in photomicrographs captured under magnification of x400 with a digital camera (DP70, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan). For each animal, 25

histological fields of cavernous tissue were photographed. In these photomicrographs the smooth muscle surface density was quantified by two different methods, as described below. All the morphometrical analysis was performed by the same researcher.

**Counting-point-method** (Baddeley et al., 1986; Costa et al., 2006; De Souza et al., 2012a, 2012b; Ribeiro et al., 2013)

For this analysis, the Image J software (version 1.45s, National Institutes of Health, Bethesda, USA) was used. For this method, a 99 point grid was superimposed over the images using the “grid” tool of Image J software. The points touching smooth muscle was marked and counted with the “cell counter” tool of the software. The number of points touching smooth muscle was multiplied by 100 and divided by 99 to correct for the 99 points used as test system (Figure 1B). This result was considered the surface density, expressed in percentage. The smooth muscle surface density of each animal was considered as the mean of the 25 analyzed photomicrographs.

**Color-based segmentation** (Sun et al., 2010; Miranda et al., 2012; Gallo et al., 2014)

For this analysis, the Image Pro-plus software (version 4.5.0.29z, Media Cybernetics, Rockville, USA) was used. The smooth muscle surface area was calculated by the histogram tool after a color segmentation of the image. This is based on automatically counting the percentage of pixels with the same specific color (brown in the present immunohistochemistry images).

Firstly, the brown colored pixels in the image were marked with the “perform segmentation” tool selecting different positive stained areas. After selecting the brown areas on the image, a mask is created with the “new mask” tool. All selected areas are

transformed in white colored pixels while the remaining pixels of the images appear in black colored pixels (Figure 1C). Then, the “histogram” tool is opened and moving the bar to the right, the percentage of white pixels is determined by the software (Figure 1D). This percentage represents the surface density of brown colored areas, previously selected, and thus, the smooth muscle surface density. The smooth muscle surface density of each animal was considered as the mean of the 25 analyzed photomicrographs.

### **Statistical Analysis**

The means of WKY versus H analyzed by the two different methods were compared with the unpaired Student's-t-test. Also, the means of WKY and H groups analyzed by the Counting-point-method versus the Color-based segmentation method were compared with the paired Student's-t-test. All analyses were performed in GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, EUA). Mean differences were considered of significance when  $p < 0.05$ . All results are presented as mean  $\pm$  standard deviation.

## RESULTS

When comparing the smooth muscle surface density of groups WKY and H, as analyzed by the point-counting-method, it was observed that the hypertensive animals had an increase of 29% in this parameter ( $p=0.01$ ). When the groups were compared by the color-based segmentation method, the smooth muscle surface density of H animals was 25% higher than WKY animals ( $p=0.03$ ) (Figure 2).

When comparing the smooth muscle surface density of WKY animals assessed by the different methods, no difference was found between the means ( $p=0.12$ ). However when this parameter was compared on H animals, the mean obtained by the point-counting-method was 15% higher than the obtained by the color-based segmentation method ( $p=0.001$ ).

All numerical data is present in table 1.

## DISCUSSION

The quantification of morphological structures is highly recommendable for studying biological alterations in tissues, cells or intracellular organelles. Translating the morphology in numbers is useful for the researcher as it is possible to better understand how the specimen studied behaves (Cruz-Orive and Weibel, 1990; Mandarim-De-Lacerda, 2003). Also, numerical data allows statistical comparison with other specimens, submitted to different conditions or in different times of development. Based on these premises, morphometry have been largely used in different fields of biomedical research, and important scientific knowledge has coming from morphometrical analyses (Barbuto et al., 2004; Da Costa et al., 2007; Chen et al., 2013; Costa et al., 2013).

Surface density is one of the most used morphometrical tool. This measurement represents the percentage of area occupied by the measured structure and thus, accordingly to Delesse´s principle, gives an important estimation of the amount of this structure (Baddeley et al., 1986; Anderson et al., 1994). The importance of the surface density measurements motivates these authors to studying specifically this tool.

However, since there is important intra and inter-individual differences (the normal biological variation) for the same structure quantified, the number of measurements used for adequate estimation of the surface density should be taken into account. One principle used for the determination of the numbers of measurements is that the structure measured by the point-counting-method should be touched by 200 points for each individual (Cruz-Orive and Weibel, 1990). Accordingly, for measuring the smooth muscle of the rat´s corpus cavernosum, 20 fields with 99 counted-points in each should be enough. Commonly in our studies of cavernous tissue (in different

species), the measurement of the surface density is performed on 25 fields with 99 or 100 points each. In the present studies we decided to use the traditional protocol of the laboratory and study 25 fields per animal. Considering the number of animals studied per group (10), it comes on 250 fields or 24,750 points analyzed.

Certainly obtaining surface density by the point-counting-method is time consuming. The analysis should be performed with full attention of the observer for avoiding over-counting of the structure of interest or miss points that touches the studied structure. In order to speed the surface density analysis, several groups are now using the color-based segmentation method (as used in the present study or with some variations of it) (Sun et al., 2010; Gallo et al., 2014; Yang et al., 2014). These methods are based on the principle that the different structures on the field may be stained with different colors, and many image editing software can measure the percentage of pixels of one color. This measurement can be performed in few steps accelerating the achievement of the final research result. Additionally, with the color-based segmentation method all the field is analyzed while with the point-counting-method just some “samples” of the images (where the superimposed points are located) are analyzed. This should highly increase the precision of the method, and should count in favor to the color-based segmentation method.

However, the great advantage of the so-called automatic method is the absence of the interference of the observer. As mentioned before, one distract researcher counting points could miss to count some points touching the structure of interest, underestimating its surface density. Also, the over counting a structure’s surface density is also possible since all the analysis is directly dependent of the observer. With the automatic methods, in principle, this should not occur as the analysis should not be interpreted by an individual. Nevertheless, the discrepancies of different tones of the

same color are not automatically adjusted by the software. The analyzed color is not uniformly presented in the same image and in different images. For example, in the immunohistochemical preparations of this study, different tones of brown were presented, most of them corresponding to smooth muscle. Thus, the variation of the same color should be manually adjusted by the observer. This not only adds bias to the analysis but also takes time from the researcher to perform the analysis. With this tool, the researcher may systematically over or under count the structure of interest, thus special attention should be taken when using this tool.

In the present study, the interpretation of the results was not affected by the method used for obtaining the cavernous smooth muscle surface density. The analyzed parameter showed a statistically significant increase on the hypertensive animals. This increase was very near when the different methods were used (25%/29%). However we observed that for both normotensive and hypertensive groups, the results when obtained by the color-based segmentation method were lower than those obtained by point-counting. Although this difference was not statistically significant on the results of the normotensive group, in the hypertensive group this was statistically different, indicating that the two used methods bring different results.

It is possible that when using the point-counting-method, some points that did not touch the smooth muscle were counted as touching it, thus giving an overcounted result. However, it is easier to believe that when using the color-based segmentation method a common mistake has occurred. When setting the software to interpret what tones should be considered as brown, some dark or light brown-colored could be missed, thus giving an undercounted result.

It is very difficult to have standardized colors through all the fields, thus, this difference of tones are common in histological images. This difficulties the appliance of

the color-based segmentation method in histological specimens and should be taken into account when choosing the method used. The present study showed that despite the interpretation of the results was not affected, differences occurs when using one or other method. In the personal opinion of the authors, despite the time consumed by the point-counting-method, the decision of what is the touched structure, point by point, by an well trained researcher is preferable than the color-based segmentation method where systematic errors may occurs in spite of the experience of the researcher.

## **CONCLUSION**

The use of either point-counting-method or color-based segmentation method did not influences the final interpretation of the results. However, results obtained by one method should not be compared to results obtained by the other, as difference was found among them.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study received grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq; [www.cnpq.br](http://www.cnpq.br)), Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ; [www.faperj.br](http://www.faperj.br)), and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; [www.capes.gov.br](http://www.capes.gov.br)), Brazil.

## **DISCLOSURE STATEMENT**

No competing financial interests exist

## REFERENCES

- Anderson, H. R., Stitt, A. W., et al. (1994). Estimation of the surface area and volume of the retinal capillary basement membrane using the stereologic method of vertical sections. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 16, 253-60.
- Baddeley, A. J., Gundersen, H. J., et al. (1986). Estimation of surface area from vertical sections. *J. Microsc.* 142, 259-76.
- Barbuto, N., Almeida, J. R., et al. (2004). Renal cortex remodeling in nitric oxide deficient rats treated with enalapril. *J. Cell Mol. Med.* 8, 102-8.
- Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., et al. (2007a). Synaptic and mitochondrial morphometry provides structural correlates of successful brain aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1097, 51-3.
- Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., et al. (2007b). Alterations of synaptic turnover rate in aging may trigger senile plaque formation and neurodegeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1096, 128-37.
- Chen, J., Toghi Eshghi, S., et al. (2013). Epithelium percentage estimation facilitates epithelial quantitative protein measurement in tissue specimens. *Clin. Proteomics* 10, 18.
- Costa, W. S., Carrerete, F. B., et al. (2006). Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU. Int.* 97, 567-9.
- Costa, W. S., Ribeiro, M. N., et al. (2013). Nutritional supplementation with L-arginine prevents pelvic radiation-induced changes in morphology, density, and regulating factors of blood vessels in the wall of rat bladder. *World J. Urol.* 31, 653-8.

- Cruz-Orive, L. M., Weibel E. R. (1990). Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am. J. Physiol.* 258, L148-56.
- Da Costa, O. T., Pedretti, A. C., et al. (2007). Stereological estimation of surface area and barrier thickness of fish gills in vertical sections. *J. Microsc.* 225, 1-9.
- De Souza, D. B., de Oliveira, L. L., et al. (2012a). Laparoscopic partial nephrectomy under warm ischemia reduces the glomerular density in a pig model. *J. Endourol.* 26, 706-10.
- De Souza, D. B., Silva, D., et al. (2012b). Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J. Androl.* 33, 735-9.
- Flisinski, M., Brymora, A., et al. (2014). Morphometric analysis of muscle fibre types in rat locomotor and postural skeletal muscles in different stages of chronic kidney disease. *J. Physiol. Pharmacol.* 65, 567-76.
- Gallo, C. B., Costa, W. S., et al. (2014). Modifications of Erectile Tissue Components in the Penis during the Fetal Period. *PLoS One.* 9, e106409.
- Kundalic, B., Ugrenovic, S., et al. (2014). Morphometric analysis of connective tissue sheaths of sural nerve in diabetic and nondiabetic patients. *Biomed. Res. Int.* 2014, 870930.
- Liu, Y. C., Chen, H. C., et al. (2013). Computer aided quantification of pathological features for flexor tendon pulleys on microscopic images. *Comput. Math. Methods Med.* 2013, 914124.
- Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *An. Acad. Bras. Cienc.* 75, 469-86.
- Miranda, A. F., Gallo, C. B., et al. (2012). Effects of castration and late hormonal replacement in the structure of rat corpora cavernosa. *J. Androl.* 33, 1224-32.

- Perica, K., Kosmides, A., et al. (2014). Linking Form to Function: Biophysical Aspects of Artificial Antigen Presenting Cell Design. *Biochim. Biophys. Acta.* In Press.
- Ribeiro, C. T., De Souza, D. B., et al. (2013). Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testicle. *Acta. Cir. Bras.* 28, 419-22.
- Romek, M., Gajda, B., et al. (2011). Mitochondrial activity and morphology in developing porcine oocytes and pre-implantation non-cultured and cultured embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 471-80.
- Sun, Y. N., Wang, Y. Y., et al. (2010). Color-based tumor tissue segmentation for the automated estimation of oral cancer parameters. *Microsc. Res. Tech.* 73, 5-13.
- Yang, T. H., Chen, H. C., et al. (2014). Clinical and pathological correlates of severity classifications in trigger fingers based on computer-aided image analysis. *Biomed. Eng. Online* 13, 100.

## FIGURE LEGENDS

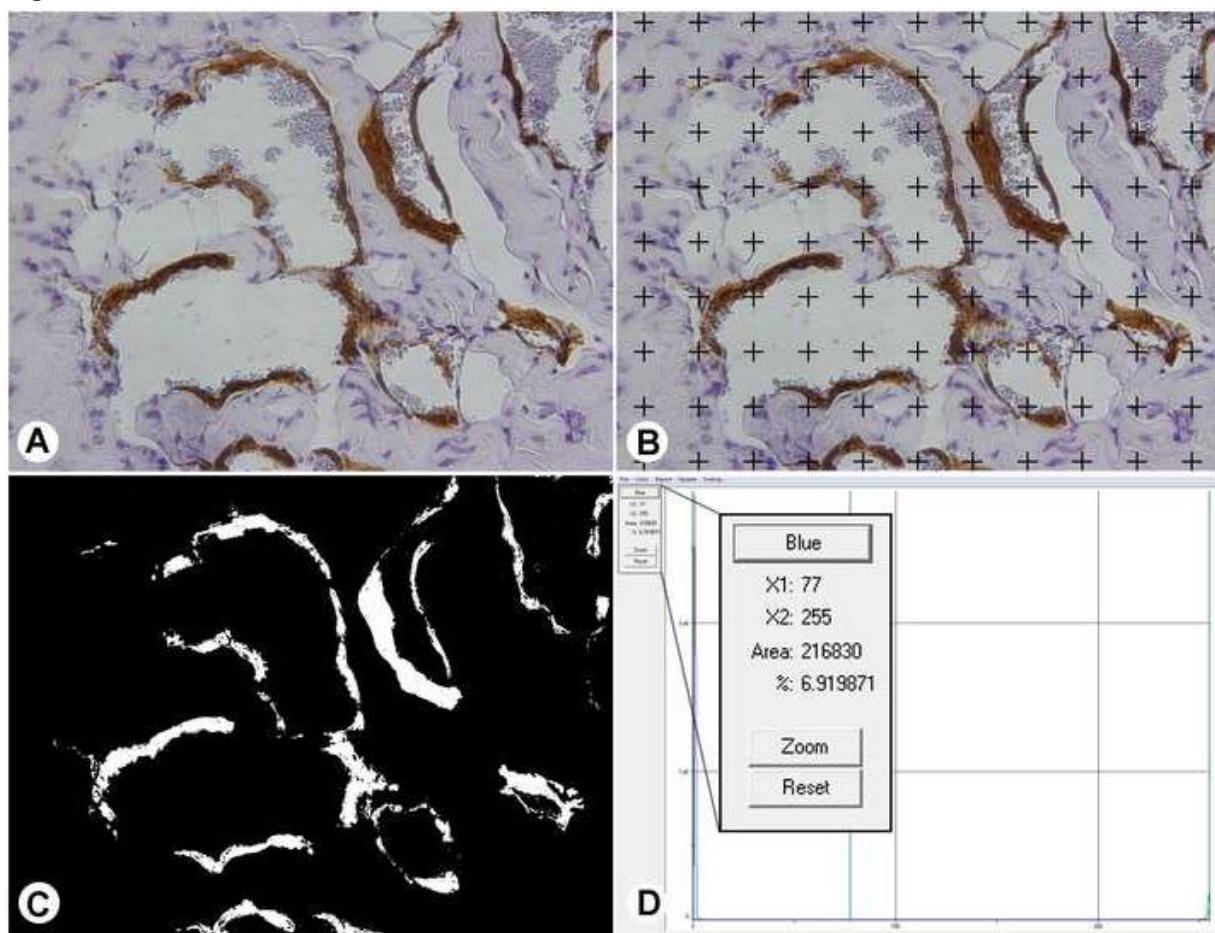
**Figure 1.** **A)** Example of a histological field of a rat´s corpus cavernosum immunostained with anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin and captured under x400 magnification. **B)** The same field after 99-point-grid have been superimposed. The points touching the smooth muscle was counted. **C)** The same field after all smooth muscle areas have been transformed in white colored pixels while the remaining pixels of the images appears in black colored pixels. **D)** The histogram of the image C showing that 6.9% of the image is composed by white pixels or smooth muscle.

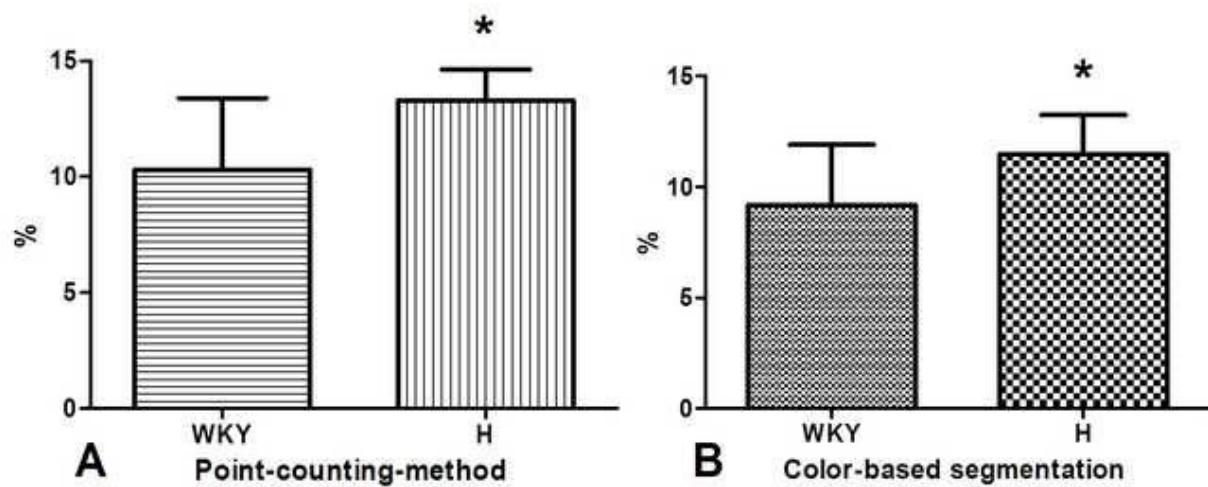
**Figure 2.** **A)** Graphic representing the smooth muscle surface density, measured by the point-counting-method, in corpora cavernosa of normotensive and hypertensive rats and chronically stressed animals (\*  $p = 0.01$ ). **B)** Graphic representing the smooth muscle surface density, measured by the color-based segmentation method, in corpora cavernosa of normotensive and hypertensive rats and chronically stressed animals (\*  $p = 0.03$ ). (mean  $\pm$  S.D.).

**Table 1.** Smooth muscle surface density of corpus cavernosum of Wistar Kyoto normotensive animals (WKY) and spontaneously hypertensive rats (H) as measured by two different morphometrical methods.

	WKY	H	p value
Point-counting-method (%)	$10.30 \pm 3.08$	$13.28 \pm 1.33$	0.01
Color-based segmentation method (%)	$09.18 \pm 2.72$	$11.48 \pm 1.76$	0.03
p value	0.12	0.001	

Data present as mean  $\pm$  standard deviation. Means were considered different when p<0.05.

**Figure 1**

**Figure 2**

## ORIGINAL ARTICLE

## Correspondence:

Luiz E. M. Cardoso, Urogenital Research Unit - UERJ, Av. 28 de Setembro, 87-fundos-FCM - térreo, Rio de Janeiro, RJ 20551-030, Brazil.  
E-mail: luizemcardoso@gmail.com

**Keywords:**  
arginine, erectile dysfunction, glutamine,  
penis, radiotherapy

Received: 23-Jan-2013

Revised: 2-Aug-2013

Accepted: 26-Aug-2013

doi: 10.1111/andr.134

## Protective effects of nutritional supplementation with arginine and glutamine on the penis of rats submitted to pelvic radiation

J. L. Medeiros Jr, W. S. Costa, B. Felix-Patricio, F. J. B. Sampaio and  
L. E. M. Cardoso

Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

## SUMMARY

Radiotherapy is widely used to treat pelvic malignancies, but normal tissues near the target tumour are often affected. Our aims were thus to determine whether the structural organization of the rat penis is altered by radiation, and whether supplementation with L-arginine (ARG) or L-glutamine (GLN) would have protective effects against these alterations. Groups of rats were treated with: no intervention (CONTR); pelvic radiation, followed by sacrifice 7 (RAD7) or 15 (RAD15) days later; and pelvic radiation, daily supplementation with ARG or GLN, followed by sacrifice 7 (RAD7+ARG, RAD7+GLN) or 15 (RAD15+ARG, RAD15+GLN) days after radiation. Structural components in the corpus cavernosum (CC), tunica albuginea of the corpus spongiosum (TACS) and urethral epithelium (UE) were analysed using stereological and immunohistochemical methods. The results showed that in the CC, connective tissue was increased by 18% in RAD15 ( $p < 0.04$ ), but this change was partially prevented in RAD15+GLN ( $p < 0.05$ ) and RAD15+ARG ( $p < 0.04$ ). The fibrous matrix of the CC trabeculae stained evenly for collagen type I. In RAD15, the intensity of the labelling was increased, whereas in RAD15+GLN and RAD15+ARG the staining was similar to that of CONTR. No staining changes were seen in the groups that were sacrificed 7 days after radiation. Cavernosal elastic fiber content in RAD15 was increased by 61% ( $p < 0.004$ ), and this was prevented in RAD15+ARG ( $p < 0.004$ ) but not in RAD15+GLN. In TACS, the amino acids protected ( $p < 0.02$ ) against the radiation-induced 92% increase in elastic fiber content, but only in RAD15. Cell density in the UE, as well as UE thickness, were reduced by 30% in RAD15 ( $p < 0.004$ ), and there were protective effects of both amino acids. In conclusion, radiation-induced alterations in penile structures tend to be more pronounced 15 days after radiation session. Both ARG and GLN have protective effects against these changes, with the former being slightly more effective.

## INTRODUCTION

Radiotherapy, alone or in combination with surgery and/or chemotherapy, is currently used in the treatment of more than half of cancer patients (Baskar et al., 2012). In addition, about 20% of patients diagnosed with pelvic cancer are treated with pelvic radiotherapy (McGough et al., 2006). This therapy modality plays an important role in the treatment of pelvic malignancies and has significantly improved patient prognosis (Turina et al., 2008). However, radiation-induced injury to adjacent normal tissues is still a limiting factor in the treatment of cancer with radiotherapy, and these side effects not only restrict radiation dose but also adversely affect quality of life (Milliat et al., 2008). Recent advances have improved targeting and other physical parameters of external beam radiotherapy (McLaughlin et al., 2005),

yet undesirable lesions to adjacent tissues still occur (Katz et al., 2010; Odrazka et al., 2010; Tao & Yang, 2012).

The progression of radiation toxicity in many normal tissues is thought to be a consequence of an initial inflammatory phase followed by late stromal alterations (Rodemann & Blaese, 2007). Pronounced fibrosis is seen mainly around blood vessels (Jaal & Dorr, 2006), and experimental models using rats showed that side effects of radiation are dose and time dependent (Marks et al., 1995). In large vessels, severe thromboembolic events or stenosis may occur, while telangiectasia is commonly seen in smaller vessels (Rodemann & Blaese, 2007). In the specific case of pelvic radiation, experimental data from animal models show that blood vessels in the bladder wall are severely affected (Costa et al., 2013). Thus, similar radiation-induced alterations in other

## Effects of Castration and Hormone Replacement in the Urinary Bladder of Rats: Structural, Ultrastructural, and Biochemical Analysis

CARLA B. M. GALLO, ALEXANDRE F. MIRANDA, BRUNO FELIX-PATRICIO, CRISTIANE F. RAMOS, LUIZ E. M. CARDOSO, WALDEMAR S. COSTA, AND FRANCISCO J. B. SAMPAIO

From the Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

**ABSTRACT:** We evaluated, by qualitative and quantitative methods, the structural alterations in the bladder wall of rats submitted to surgical castration, as well as the role of hormone replacement in reversing the possible structural alterations. Twenty-four 12-week-old male Sprague-Dawley rats were used. The animals were divided into 3 groups comprising 8 animals each and treated as follows. Members of group CONTR (control) underwent a sham operation only and were sacrificed after 2 months. Members of group ORCH (orchectomy) underwent bilateral orchectomy and were sacrificed after 2 months. Members of group ORCH+TEST (testosterone) underwent orchectomy, received testosterone replacement after 1 month, and were sacrificed 1 month later. We performed a qualitative and quantitative analysis of collagen by light microscopy, scanning electron microscopy, biochemistry, and a histomorphometric analysis of smooth muscle and elastic fibers in the 3 groups. The results showed a significant

decrease in absolute values of elastic fibers in the castrated group. The histomorphometric analysis of epithelial height did not show differences among the groups. There was no statistical difference in quantitative analysis of collagen, either by histomorphometry or by biochemistry. Also, there was no difference in the smooth muscle cells. However, the qualitative analysis revealed differences in collagen (castrated group) when compared with controls and with rats submitted to hormone replacement. Hormone replacement with testosterone was able to revert the alterations observed. The findings suggest that hormone replacement, even when instituted at a late stage, is effective in reversing the bladder wall alterations produced by secondary hypogonadism.

Key words: Testosterone, androgen deficiency, aging male, histology.

J Androl 2012;33:684–690

Androgen replacement therapy in hypogonadic men is well documented, especially because bringing testosterone concentrations back to normal serum levels partially or totally restores sexual function, mood, and muscle and bone mass (Wang et al, 2000). Understandably, testosterone effects on the prostate and penis have received more attention when compared with the other organs of the urogenital system. As such, studies dealing with other organs of the urogenital system are rare, notably those concerning the bladder wall (Cayan et al, 2008; Tek et al, 2010). However, in these studies, which used experimental animals, testosterone replacement therapy is initiated immediately after the experimental hormone deprivation. Thus, little is known about the

effects of testosterone when replacement therapy is started after a long-term period of hormone deprivation. Rekers et al (1992) showed that, in humans, hypoestrogenism decreases the connective tissue content in the bladder and urethral walls. This change causes loss of elasticity and atrophy of the urethral mucosa and bladder neck. The urethra also undergoes reductions in blood supply, collagen content, and response to adrenergic stimulation. Such events contribute to a decrease in intraurethral pressure and in the rate of transmission of the abdominal pressure to the proximal urethra, which are key factors underlying urinary continence.

Cayan et al (2008) carried out an experimental study using urodynamic and histological analysis in castrated female rats submitted to hormone replacement with testosterone alone and with testosterone and estradiol. This study showed that bladder function might deteriorate in the postmenopausal period. Similar to the effects obtained with estrogen replacement, testosterone alone also increased smooth muscle content in the bladder. This may lead to an improvement in bladder function in menopausal women with urogenital system dysfunction. With aging, the decline of testosterone contributes to increase in urinary frequency, thereby causing discomfort in elderly men (Yassin et al, 2008).

This study was supported by grants from the National Council for Research Support (CNPq), Rio de Janeiro Foundation for Research Support (FAPERJ), and Coordination for Improvement of Graduated Professionals (CAPES), Brazil.

Correspondence to: Dr Francisco J. B. Sampaio, State University of Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro, 87, fundos, FCM, Terreo, Urogenital Research Unit-UERJ 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil (e-mail: sampaio@urogenitalresearch.

Received for publication May 3, 2011; accepted for publication October 31, 2011.

DOI: 10.2164/jandrol.111.014159

## Research Article

# Anatomic Aspects of Inguinal Lymph Nodes Applied to Lymphadenectomy in Penile Cancer

**João Paulo Martins de Carvalho, Bruno F. Patrício, Jorge Medeiros, Francisco J. B. Sampaio, and Luciano A. Favorito**

*Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

Correspondence should be addressed to Luciano A. Favorito, lufavorito@yahoo.com.br

Received 4 May 2011; Accepted 28 August 2011

Academic Editor: Maxwell V. Meng

Copyright © 2011 João Paulo Martins de Carvalho et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Objectives.** To provide a better understanding of the distribution of inguinal nodes in order to prevent the complications of unnecessary and extended dissections in penile cancer. **Methods.** The bilateral inguinal regions of 19 male cadavers were dissected. Nodal distribution was noted and quantified based on anatomical location. The superficial nodes were subdivided into quarters as follows: superomedial, superolateral, inferomedial, and inferolateral. Statistical analysis was performed comparing node distribution between quarters using one-way analysis of variance (ANOVA), and the unpaired *T*-test was used between superficial and deep nodes. **Results.** Superficial nodes were found in all inguinal regions studied (mean = 13.60), and their distribution was more prominent in the superomedial quarter (mean = 3.94) and less in the inferolateral quarter (mean = 2.73). There was statistical significance between quarters when comparing the upper group with the lower one ( $P = 0.02$ ). Nodes were widely distributed in the superficial region compared with deep lymph nodes (mean = 13.60 versus 1.71,  $P < 0.001$ ). **Conclusions.** A great number of inguinal lymph nodes are distributed near the classical anatomical landmarks for inguinal lymphadenectomy, more prominent in upper quadrants.

## 1. Introduction

Penile cancer is an aggressive and mutilating disease that deeply affects the patient's self-esteem. Penile cancer is a rare neoplasia, particularly in developed countries. One of the world's highest prevalence rates is found in India, at 3.32 per 100,000 inhabitants, and the lowest incidence is among Jewish men born in Israel, with rates close to zero [1]. In the United States, the prevalence is 0.2 cases for each 100,000 inhabitants, whereas in Brazil, the national incidence of penile cancer 4.6 per 100,000 inhabitants (with a wide variation of 2.9 to 6.8 cases per 100,000 depending on the region), one of the world's highest rates of this neoplasia [2, 3].

The most common sites of penile cancer metastasis are the superficial and deeper nodes of the inguinal and iliac region. Patients have inguinal groin masses in 58% of cases, and 40% have positive metastasis, even in small cancers such as T1C and T2 [4].

Extended Ingual lymphadenectomy is the most useful and commonly performed surgery for staging and to cure inguinal metastasis in penile cancer cases. Although it is a widespread technique, postoperative complications often occur, such as cutaneous flap necrosis, lymphedema, and vascular lesions, including in the saphena magna ligation, with subsequent deeper venous thrombosis of the affected limb [5].

Knowledge of the inguinal region and node distribution is important to prevent such complications and to diminish the morbidity caused [6, 7]. The venous drainage of the inguinal region occurs mainly through the external pudendal, superficial circumflex iliac and saphena magna veins. The inguinal nodes are one of the major lymphatic blocs of the human body. They are responsible for drainage of the inferior limbs, genitalia, posterior perineum, and inferior extremity of the abdominal wall. The nodes can be subdivided into two groups: superficial, placed just below the subcutaneous, and deeper inguinal nodes, close to the

**ANEXO - Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais**



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



**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/051/2012 sobre "**ESTUDO ESTRUTURAL, ULTRAESTRUTURAL E MOLECULAR DOS EFEITOS DE DIFERENTES TRATAMENTOS NO SISTEMA UROGENITAL DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**", sob a responsabilidade de Waldemar da Silva Costa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em **03/10/2012**. Este certificado expira em **03/10/2016**.

Rio de Janeiro, 03 de Outubro de 2012.

Patrícia Lisboa da Silva

Profa. Patricia Cristina Lisboa  
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb  
CEUA/IBRAG/UERJ

1.º as Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva  
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ  
Matrícula 34765-8

Phone (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748

biologia@uerj.br