



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Roger Gaspar Marchon

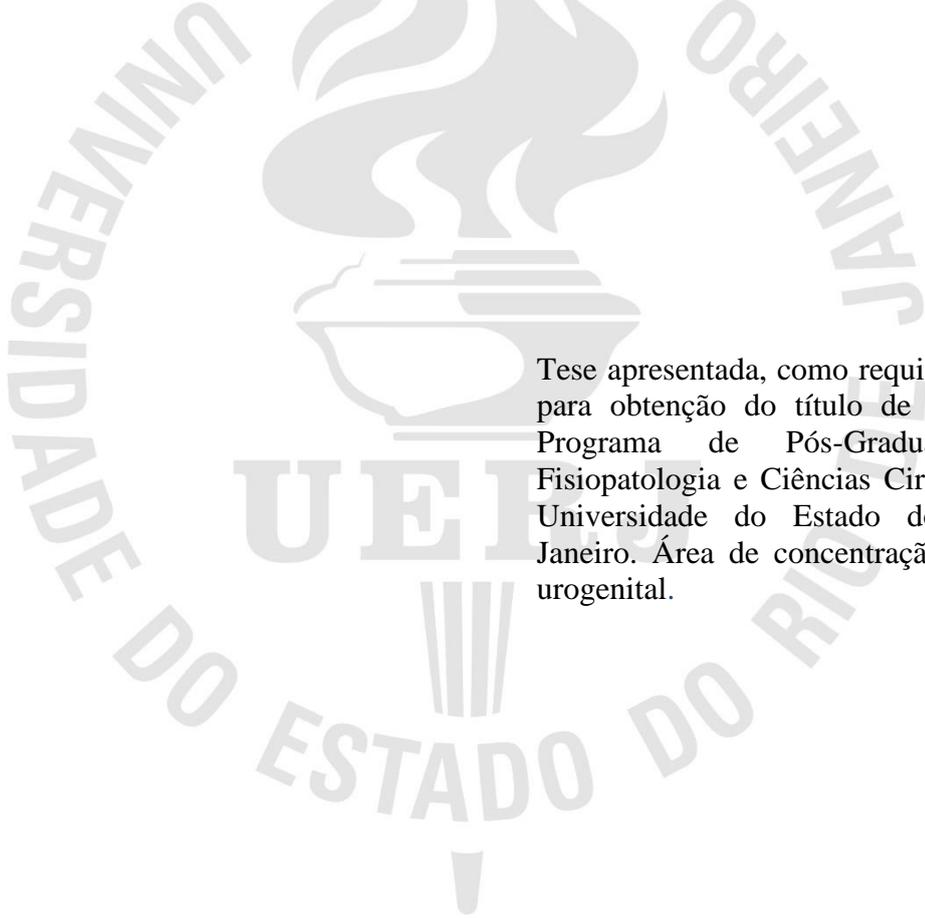
**Efeito do estresse crônico na preferência alimentar e na morfologia do pênis  
de ratos Wistar adultos**

Rio de Janeiro

2023

Roger Gaspar Marchon

**Efeito do estresse crônico na preferência alimentar e na morfologia do pênis de ratos  
Wistar adultos**



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. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Rio de Janeiro

2023

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

M318 Marchon, Roger Gaspar.

Efeito do estresse crônico na preferência alimentar e na morfologia do pênis de ratos  
Wistars adultos / Roger Gaspar Marchon – 2023.  
82 f.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza  
Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

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

1. Estresse psicológico – Fisiopatologia – Teses. 2. Sistema hipotálamo-hipofisário.  
3. Pênis – Crescimento & desenvolvimento – Teses. 4. Comportamento alimentar –  
Psicologia – Teses. I. Souza, Diogo Benchimol de. II. Sampaio, Marco Aurélio Pereira.  
III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV.  
Título.

CDU 616.665:591.131.1

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

---

Assinatura

---

Data

Roger Gaspar Marchon

**Efeito do estresse crônico na preferência alimentar e na morfologia do pênis de ratos  
Wistar adultos**

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 26 de  
junho de 2023

Orientador:

Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Coorientador

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

---

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

---

Prof. Dr. José Aurelino Damasceno Ferreira Filho

Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Leonardo de Albuquerque dos Santos Abreu

Hospital Federal dos Servidores do Estado

---

Prof. Dr. Bruno Félix Patrício

Universidade Federal Fluminense

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese a minha esposa Isabela, minha inspiração.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus.

Agradeço a minha amada esposa Isabela e aos familiares pela compreensão de minha ausência por esse período de formação.

Agradeço ao Coordenador do programa de pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas Professor Luciano Favorito, PhD, e ao coordenador da área de sistema urogenital Professor Francisco José Barcellos Sampaio, PhD, que tanto zelam e se dedicam pela qualidade e excelência deste programa.

Agradeço ao Professor Diogo Benchimol de Souza que me acolheu e tanto me ensinou e ensina nesse percurso ao longo da minha caminhada na pesquisa. Agradeço pelos momentos de descontração, incentivo e cobranças que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente. Agradeço também ao Professor Marco Aurélio Pereira Sampaio pelo apoio e ensinamentos.

Agradeço ao Professor Bruno Félix Patrício, que me apresentou à anatomia com tanto zelo e paixão que foi impossível não se interessar. Me mostrou os encantos da pesquisa sem deixar de mostrar também os desafios deste caminho. E ainda agradeço pela companhia e pelos momentos de descontração.

Agradeço ao Professor Waldemar Silva Costa, Professora Bianca Martins Gregório e a Professora Carla Braga Mano Gallo pelos ensinamentos, momentos de descontração e de tão agradável convívio. E a todos amigos e amigas que me acompanharam até aqui: Marcello da Silva, Edilaine Alves, Aline Souza, Priscila dos Santos, Rômulo Ferreira, Fabiana de Oliveira, Flávia de Lima, Pamela Campos, Gabriela Gonçalves, Carina Ribeiro, Matheus Naus, Carolinne Ramos, Claudio Lau e tantos outros que contribuíram de alguma forma para minha formação. Todos sempre se mostraram dispostos a compartilhar suas experiências e conhecimentos para o meu percurso dentro da Unidade de Pesquisa Urogenital.

Agradeço a Tia Terezinha, por me ceder seu lar e me acolher no Rio de Janeiro com muito carinho e amor, sempre me incentivando nos estudos e dando apoio na minha formação.

Agradeço à FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) pela concessão de bolsa (nº: E-26/201.660/2019) para realização deste trabalho.

Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.

*São Francisco de Assis*

## RESUMO

MARCHON, Roger Gaspar. **Efeito do estresse crônico na preferência alimentar e na morfologia do pênis de ratos Wistars adultos**. 2023. 82 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

O estresse ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal aumentando a secreção de cortisol e catecolaminas. A elevação dos glicocorticóides aumenta a procura por atividades prazerosas (ingestão de açúcares, gorduras e drogas). Entretanto, ainda não se sabe se o aumento pela procura por alimentos do tipo *comfort food* (ricos em açúcares e gorduras) podem atenuar os efeitos deletérios do estresse ou se potencializa o efeito prejudicial ocasionado pelo estresse crônico. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do estresse crônico na preferência alimentar e na morfologia do pênis de ratos Wistar adultos. Foram utilizados 32 ratos Wistar adultos com 10 semanas de idade. Divididos em quatro grupos experimentais: controle com dieta padrão (C, n=8); estresse com dieta padrão (S, n=8); controle com dieta padrão + *comfort food* (CF, n=8) e estresse com dieta padrão + *comfort food* (SCF, n=8). Os animais dos grupos S e SCF foram submetidos a estresse crônico por contenção. Foi realizada eutanásia em todos os ratos ao completarem 18 semanas de idade, para coleta e avaliação do pênis. Foi avaliado a glicemia capilar, o peso corporal e a ingestão alimentar em gramas e em Kcal/kg. No pênis foram analisadas a área total do pênis, área total do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea e a área da túnica albugínea. Foram avaliadas também as densidades de músculo liso, tecido conjuntivo e espaço sinusóide do corpo cavernoso. Para análise dos dados paramétricos foi utilizado a análise de variância one-way (ANOVA) com aplicação do pós-teste de Newman-Keuls. Para dados não-paramétricos foi utilizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns. As diferenças das médias foram consideradas significativas quando o valor  $p < 0,05$ . Não houve diferença estatística quanto a glicemia capilar ao final do experimento. O grupo SCF apresentou redução do peso corporal ao final do experimento ao comparar com o grupo CF. Quanto ao ganho de massa corporal o grupo S apresentou redução em relação ao grupo C. Os animais do grupo SCF demonstraram preferência pela dieta do tipo *comfort food* na comparação com o CF. No grupo S houve redução na área total do pênis e na área do corpo cavernoso com túnica albugínea na comparação com o grupo CF. Houve aumento de tecido conjuntivo nos grupos S e SCF ao comparar com o grupo C. Também houve aumento de tecido conjuntivo no S ao comparar com o grupo CF. Houve redução de músculo liso no grupo C ao compará-lo com os grupos S e SCF. Houve também redução de músculo liso no grupo CF na comparação com o grupo SCF. Houve redução do espaço sinusóide no grupo C na comparação com o grupo S. Nas demais comparações não houve diferença estatística. Concluímos que os animais apresentam preferência alimentar pela dieta do tipo *comfort food*, entretanto o consumo não alterou os parâmetros biométricos. O estresse crônico foi capaz de diminuir a área total do pênis e modificar a composição tecidual do corpo cavernoso com substituição de tecido erétil por tecido não erétil. Nas comparações morfométricas o alimento de conforto sugere redução nos efeitos deletérios do estresse crônico.

Palavras-chave: estresse crônico; pênis; corpo cavernoso; morfometria; *comfort food*.

## ABSTRACT

MARCHON, Roger Gaspar. **Effect of chronic stress on food preference and penile morphology in adult Wistar rats.** 2023. 82 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Stress activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, increasing the secretion of cortisol and catecholamines. The elevation of glucocorticoids increases the search for pleasurable activities (intake of sugars, fats and drugs). However, it is not yet known whether the increased demand for comfort foods (rich in sugars and fats) can attenuate the deleterious effects of stress or whether it enhances the harmful effect caused by chronic stress. The objective of the study was to evaluate the effects of chronic stress on food preference and penile morphology in adult Wistar rats. Thirty-two 10-week-old adult Wistar rats were used. Divided into four experimental groups: control with standard diet (C, n=8); standard diet stress (S, n=8); control with standard diet + comfort food (CF, n=8) and stress with standard diet + comfort food (SCF, n=8). The animals in groups S and SCF were subjected to chronic stress by restraint. All rats were euthanized when they reached 18 weeks of age, for collection and evaluation of the penis. Capillary blood glucose, body weight and food intake in grams and Kcal/kg were evaluated. In the penis, the total area of the penis, the total area of the cavernous body with and without the tunica albuginea and the area of the tunica albuginea were analyzed. The densities of smooth muscle, connective tissue and sinusoid space of the corpora cavernosa were evaluated. The Kolmogorov-Smirnov normality test was applied. For parametric data, one-way analysis of variance (ANOVA) was used with the application of the Newman-Keuls post-test. For non-parametric data, the Kruskal-Wallis statistical test and the Dunns post test were used. Mean differences were considered significant when the p value <0.05. There was no statistical difference regarding capillary blood glucose at the end of the experiment. The SCF group showed a reduction in body weight at the end of the experiment when compared with the CF group. As for body mass gain, group S showed a reduction in relation to group C. The animals in the SCF group showed a preference for the comfort food type diet compared to the CF group. In group S there was a reduction in the total area of the penis and in the area of the cavernous body with tunica albuginea in comparison with the CF group. There was an increase in connective tissue in groups S and SCF when compared with group C. There was also an increase in connective tissue in S when compared with group CF. There was a reduction in smooth muscle in group C when compared with groups S and SCF. There was muscle reduction in the CF group compared to the SCF group. There was a reduction in the sinusoid space in group C compared to group S. In the other comparisons, there was no statistical difference. We conclude that the animals have a food preference for the comfort food type diet, however the consumption did not change the biometric parameters. Chronic stress was able to decrease the total area of the penis and modify the tissue composition of the corpora cavernosa with replacement of erectile tissue by non-erectile tissue. In morphometric comparisons, comfort food suggests a reduction in the deleterious effects of chronic stress.

Keywords: chronic stress; penile; corpus cavernosum; morphometry; comfort food.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Anatomia do pênis de rato Wistar e do pênis humano.....	17
Figura 2 –	Descrição das estruturas internas do pênis de rato Wistar e humano em corte transversal.....	18
Figura 3 –	Divisão dos animais controles e estressados nos diferentes grupos experimentais.....	22
Figura 4 –	Tubos de PVC opacos utilizados para indução do estresse crônico.....	23
Figura 5 –	Seleção da fotomicrografia com a régua micrometrada para calibração do programa <i>Image J</i> .....	26
Figura 6 –	Fotomicrografia da régua em micrômetros para calibração da distância conhecida em pixels.....	27
Figura 7 –	Mensuração de uma distância conhecida na régua micrometrada após utilização da ferramenta “Magnifying glass” para aproximar a imagem.....	28
Figura 8 –	Abertura da caixa de diálogo para calibração do programa <i>Image J</i> .....	29
Figura 9 –	Preenchimento dos campos para calibração do programa <i>Image J</i> .....	30
Figura 10 –	Mensuração da área total do pênis após calibração do programa <i>Image J</i> .....	31
Figura 11 –	Mensuração da área do CC com a TA.....	32
Figura 12 –	Mensuração da área do CC sem a TA.....	33
Figura 13 –	Mensuração da TA por meio da subtração das mensurações das áreas do CC com e sem TA.....	34
Figura 14 –	Seleção da fotomicrografia para análise da Sv do corpo cavernoso.....	35
Figura 15 –	Mensuração da área total da imagem em pixel no programa <i>ImageJ</i> .....	36
Figura 16 –	Distribuição da grade de 99 pontos sobre a fotomicrografia.....	37
Figura 17 –	Preenchimento da caixa de diálogo para configurar grade de pontos de sobrepor a fotomicrografia.....	38
Figura 18 –	Contagem de pontos utilizando o contador “Cell Counter” .....	39
Figura 19 –	Imagens histológicas que ilustram as alterações das áreas do pênis de ratos Wistars adultos.....	48
Figura 20 –	Fotomicrografias do corpo cavernoso do pênis de ratos Wistar adultos que ilustram as alterações morfométricas.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas experimentais.....	24
Tabela 2 – Dados biométricos e valores das análises morfométricas de ratos Wistar estressados e controles com e sem oferta de dieta do tipo <i>comfort food</i> .....	53

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Valores da glicemia antes do período experimental.....	41
Gráfico 2	Valores da glicemia após o período experimental.....	42
Gráfico 3	Valor da massa corporal dos animais após o experimento.....	42
Gráfico 4	Preferência alimentar dos animais dos grupos com dieta <i>comfort food</i> .....	43
Gráfico 5	Comparação do consumo energético dos indivíduos por quilograma de massa corporal.....	44
Gráfico 6	Comparação entre os grupos experimentais das mensurações da área total do pênis.....	45
Gráfico 7	Comparação das médias das áreas do CC do pênis com TA.....	4
Gráfico 8	Comparação da área do CC sem TA dos grupos experimentais.....	47
Gráfico 9	Comparação entre as médias da área da TA do CC.....	47
Gráfico 10	Sv de músculo liso no CC de ratos wistars estressados e controles com e sem a oferta de dieta do tipo <i>comfort food</i> .....	49
Gráfico 11	Sv de tecido conjuntivo no CC de ratos Wistars estressados e controles com e sem oferta de dieta do tipo <i>comfort food</i> .....	50
Gráfico 12	Sv de espaço sinusóide no CC de ratos Wistars estressados e controles com e sem oferta de dieta do tipo <i>comfort food</i> .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
PVC	Policloreto de vinila
NIH	National Institutes of Health
EUA	Estados Unidos da América
Sv	Densidade de superfície
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
PA	Pressão arterial
CC	Corpo cavernoso
TA	Túnica albugínea

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
µm	Micrômetro
µl	Microlitro
mL	Mililitro
g	grama
†	Eutanásia
mg	Miligrama
dL	Decilitro

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
1.1	<b>Geral</b> .....	20
1.2	<b>Específicos</b> .....	20
2	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	21
2.1	<b>Modelo de indução de estresse crônico</b> .....	22
2.2	<b>Dieta</b> .....	23
2.3	<b>Eutanásia</b> .....	24
2.4	<b>Teste de glicemia capilar</b> .....	25
2.5	<b>Procedimentos histológicos</b> .....	25
2.6	<b>Morfometria</b> .....	25
2.6.1	<u>Análise da área do corte transversal do pênis</u> .....	26
2.6.2	<u>Análise de densidade de superfície (Sv)</u> .....	35
2.7	<b>Análise estatística</b> .....	40
3	<b>RESULTADOS</b> .....	41
3.1	<b>Resultados das análises biométricas e bioquímicas</b> .....	41
3.2	<b>Resultado das análises de comportamento alimentar</b> .....	43
3.3	<b>Avaliações morfométricas</b> .....	44
3.3.1	<u>Mensuração da área do pênis</u> .....	44
3.3.2	<u>Densidades de superfície (Sv) do corpo cavernoso</u> .....	49
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
	<b>ANEXO A - Aprovação do estudo pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA)</b> .....	62
	<b>APÊNDICE A - Artigo 1</b> .....	63
	<b>APÊNDICE B - Artigo 2</b> .....	71

## INTRODUÇÃO

O termo estresse foi introduzido no meio biológico pelo médico endocrinologista Hans Selye, o qual, define o estresse como a resposta do organismo frente aos estímulos nocivos. Selye (1946), identificou que, além das reações específicas adaptativas do organismo para a retomada da homeostase, existem manifestações que são sempre as mesmas, independente da especificidade do agente causador. Esse conjunto de reações inespecíficas descritas por Selye foi denominado de Síndrome de Adaptação Geral (SAG), que engloba algumas fases que estão descritas a seguir.

A fase de alarme é a primeira a ser descrita. Nesta fase o organismo detecta um agente estressor desencadeando uma resposta rápida, mediada por catecolaminas liberadas pela ativação do eixo-hipotálamo-hipófise-adrenal (CHAGAS, 2010; ROM, O.; REZNICK, A. Z., 2016).

Já a segunda, é a fase de resistência, na qual prossegue a liberação de catecolaminas favorecendo maior aporte energético às células, e ocorre a hiperatividade da glândula adrenal aumentando a liberação de glicocorticóides (CHAGAS, 2010; ROM, O.; REZNICK, A. Z., 2016).

E por último temos a terceira, a fase de exaustão, que ocorre quando a persistência do estímulo estressor esgota a capacidade energética limitada dos mecanismos de adaptação desencadeados pelo organismo, os quais, não são capazes de mantê-los. Nesse etapa, as falhas progressivas dos mecanismos de defesa, dão a esta fase as características similares a fase de alarme. Os sinais do estresse são potencializados, tornando o organismo susceptível à doenças (CHAGAS, 2010; SZABO, S.; TACHE, Y.; SOMOGYI, A., 2012; ROM, O.; REZNICK, A. Z., 2016).

Todo esse mecanismo hormonal tem por simples propósito, fornecer meios ao indivíduo de superar as situações de perigo, seja lutando ou fugindo. Em situações de estresse, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é ativado, aumentando a secreção de cortisol e catecolaminas, adrenalina e noradrenalina (RETANA-MARQUEZ et al., 2003; SZABO, S.; TACHE, Y.; SOMOGYI, A., 2012; ROM, O.; REZNICK, A. Z., 2016).

Estes hormônios, liberados pela glândula adrenal, regulam ações do sistema nervoso autônomo simpático em respostas sistêmicas do organismo. As catecolaminas têm papel fundamental nestas alterações pois são responsáveis pelo aumento da frequência cardíaca, circulação sanguínea nos músculos esqueléticos e diminuem as reservas de glicogênio para

aumento do aporte de energia disponível (ULRICH-LAI, Y. M., et al. 2015; VAN BODEGOM, M.; HOMBERG, J. R.; HENCKENS, M., 2017).

Por meio dessa cadeia de eventos, a homeostase pode ser afetada por mudanças fisiopatológicas, sendo capaz de gerar desequilíbrio do organismo frente ao estímulo estressor (SELYE, H., 1946). A hiperativação do eixo HPA, eleva a circulação de glicocorticóides (GCs) que podem levar a alterações na adiposidade e no crescimento (OLIVEIRA et al., 2015). A elevação dos GCs aumentam a excitação por atividades prazerosas (ingesta de açúcares, gorduras, drogas, atividades físicas). Como consequência da hiperativação do eixo HPA, é visto uma relação da elevação do nível de cortisol (corticosterona em ratos) e diferentes parâmetros em relação ao ganho de peso, como a obesidade e o acúmulo de gordura visceral (TOMIYANA et al., 2011; SCOTT, K.A.; MELHORN, S.J.; SAKAI, R.R., 2012; OTOLANI et al., 2014; PECORARO et al. 2004).

Sob esta linha de investigação, alguns estudos têm relacionado o estresse crônico a hiperfagia (OLIVEIRA et al., 2014; TOMIYANA et al., 2011; SCOTT, K.A.; MELHORN, S.J.; SAKAI, R.R., 2012; ZEENI et al., 2013) enquanto outros apontam para uma hipofagia (TANENBAUM et al., 1997; PAPP, M.; WILLNER, P. e MUSCAT, R., 1991). Também não é unânime a relação da preferência alimentar em situações de estresse (ORTOLANI et al., 2014), apesar de ter sido percebido em alguns estudos a preferência por alimento do tipo comfort food (ZEENI et al., 2013), que em suma, têm por características serem altamente palatáveis, de grande valor energético, tipicamente ricos em açúcares e gorduras (PECORARO et al., 2004).

Ao investigar o efeito da dieta hiperlipídica na parede da bexiga de ratos e a possível ação protetora da castanha-do-brasil, um estudo identificou que dietas com alto valor energético, ricas em lipídeos, podem ser deletérias ao órgão (de SOUZA, et al., 2018). Também foi visto a ação danosa da dieta hiperlipídica no pênis (MEDEIROS JUNIOR et al., 2014), na atividade secretadora da próstata e na espermatogênese de ratos adultos Wistar (CAMPOS-SILVA et al., 2015). Já o estresse crônico isolado tem sido apontado como prejudicial a morfologia do pênis (RIBEIRO et al., 2019), das células espermatogênicas (RIBEIRO et al., 2018) e do rim de ratos Wistar adultos (BENCHIMOL DE SOUZA et al., 2011; MARCHON, et al., 2018).

O órgão selecionado para este estudo, o pênis, tem sido citado na literatura como órgão que pode ser afetado pela influência do estresse crônico. Essa relação foi descrita, por exemplo, em um estudo realizado por De Souza e colaboradores (2012), onde ao investigar os efeitos do estresse crônico sobre o corpo cavernoso do pênis de ratos observou alteração na composição

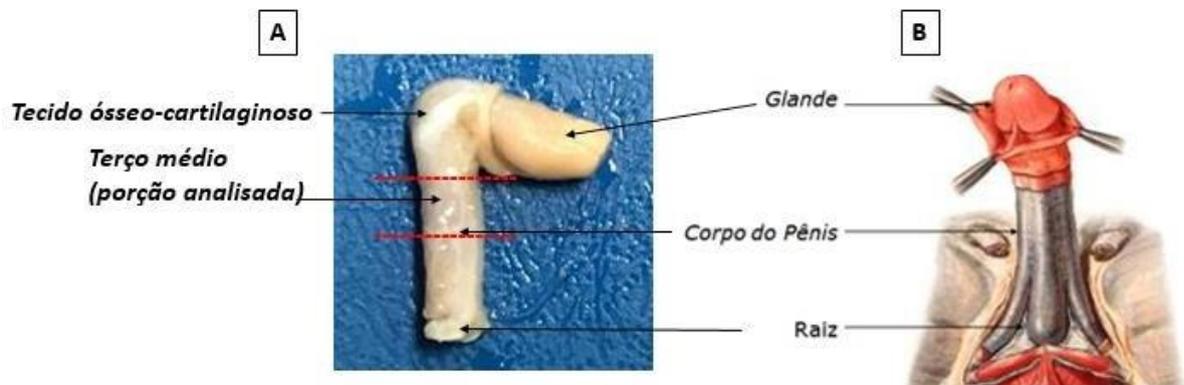
do tecido erétil, apresentando um aumento de tecido conjuntivo e redução de músculo liso. Outro achado deste estudo foi a maior prevalência de fibras colágenas do tipo I nos animais estressados do que em animais controle. Também foi observado uma diminuição nas concentrações séricas de testosterona e um aumento no índice de massa da glândula adrenal. Tais características teciduais encontradas se assemelham com um perfil de fibrose peniana que pode contribuir diretamente na disfunção erétil.

Um outro estudo elaborado por Ribeiro e colaboradores (2018) avaliou a relação do estresse crônico em diferentes momentos da vida do animal e seu efeito sobre o corpo cavernoso do pênis de ratos. Como resultados dessas análises foi observado uma redução no tecido erétil e aumento de tecido fibroso nos animais estressados, sendo os animais adultos mais afetados pelos efeitos deletérios do estresse do que os animais jovens. Neste experimento não houve uma redução nos níveis de testosterona causados pelo estresse, entretanto, o estresse foi capaz de influenciar negativamente a densidade de tecido erétil no corpo cavernoso.

O pênis humano, é o órgão sexual masculino e faz parte do sistema urinário. Sua composição se dá principalmente por dois corpos cavernosos e um corpo esponjoso, esse último pelo qual ocorre a passagem da uretra. Podemos dividir o pênis ainda em uma porção fixada, também chamada de raiz, e uma porção livre, conhecida como corpo. Quanto a raiz do pênis é composta pela fixação das partes proximais dos dois corpos cavernosos e proximal do corpo esponjoso, sendo fixada no arco do pube e na membrana perineal, respectivamente. Já o corpo do pênis, completamente revestido por pele, tem como composição as partes livres do par de corpos cavernosos e a parte livre do corpo esponjoso. A expansão do corpo esponjoso da origem a glândula do pênis que avança sobre as extremidades distais dos corpos cavernosos (NETTER, 2019).

Em comparação ao modelo experimental adotado neste estudo, em que avalia as alterações morfológicas no pênis de ratos Wistars, pode-se citar semelhanças e individualidades. O pênis do rato também composto por um par de corpos cavernosos, apresenta-se em sua porção livre como duas estruturas cilíndricas, que se conectam inferiormente ao corpo esponjoso, apresentando uma única túnica albugínea. Este último por sua vez, possui em sua porção distal um prolongamento formando a glândula do pênis, estrutura esta projetada sobre a porção distal dos corpos cavernosos (figura 1). Também é no corpo esponjoso do pênis do rato que ocorre a passagem da uretra.

Figura 1 - Anatomia do pênis de rato Wistar e do pênis humano



**Legenda:** A: Fotografia do pênis de rato Wistar adulto (magnificação de 5x em estereoscópio com objetiva de 1.5x) seccionado transversalmente na base do pênis. B: Ilustração do pênis humano com exposição da fáscia profunda do pênis apresentando a fixação dos corpos cavernosos e corpo esponjoso no arco do pube e na membrana perineal.

**Fonte:** Em A fotografia do autor em B adaptação da ilustração do livro NETTER (2019).

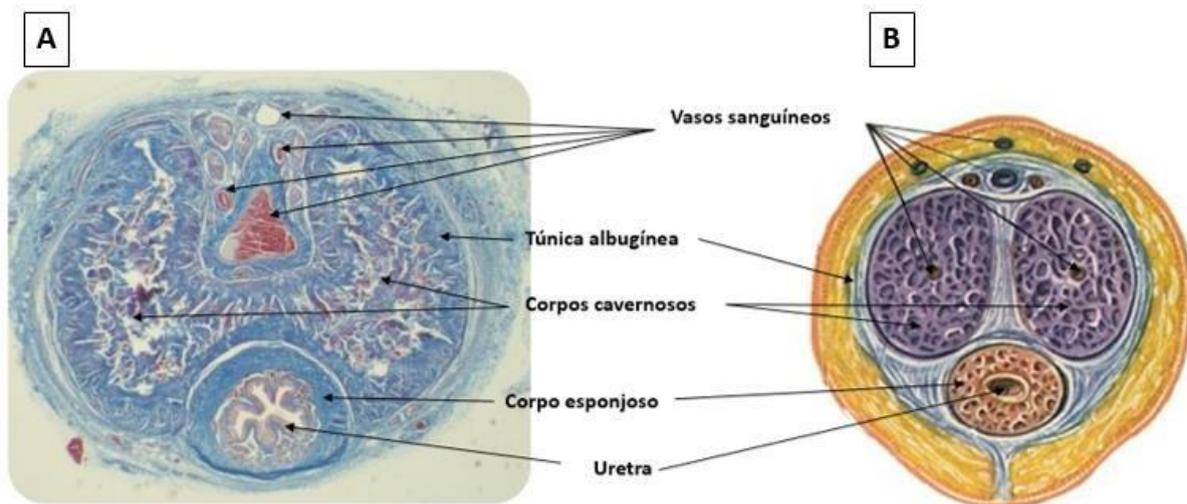
Quanto a estrutura interna do pênis, pode-se justificar a viabilidade do modelo ao compararmos também a composição tecidual das diferentes espécies. No pênis humano, assim como no pênis dos ratos, os corpos cavernosos são envolvidos por uma camada de tecido conjuntivo denso, denominada de túnica albugínea, entretanto, a separação que ocorre por completa entre os corpos cavernosos pela túnica albugínea do pênis humano (figura 2), não acontece nos corpos cavernosos do pênis do rato, que preserva uma conexão entre essas duas estruturas (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, 2017).

Vale destacar que o pênis do rato apresenta tecido osso-cartilaginoso em sua porção distal (VILMANN, H.; VILMANN, A., 1979) o que inviabilizaria a aplicação de estudo como modelo experimental, entretanto, o terço médio responsável pela maior composição do tecido erétil se assemelha ao pênis humano, portanto, foi padronizado como parte do pênis do rato a ser analisado (figura 1). Já o tecido erétil que compõem as estruturas dos corpos cavernosos e corpo esponjoso, possuem abundante quantidade de espaços venosos segregados por trabéculas compostas de fibras de tecido conjuntivo e células musculares lisas, que ocorre nas duas espécies (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, 2017).

Assim como, o processo hemodinâmico de ereção do órgão ocorre pelo controle de impulsos nervosos sobre o músculo liso tanto das trabéculas que cercam o espaço venoso quanto das artérias do pênis. O fluxo de sangue no estado flácido do pênis é mantido pelo tônus intrínseco da musculatura lisa e por impulsos contínuos de inervação simpática. Na ereção, os

impulsos vasodilatadores do parassimpático dão origem ao relaxamento da musculatura dos vasos penianos e músculo liso presente nos corpos cavernosos. Em associação os impulsos simpáticos são inibidos, inibindo a vasoconstrição. A abertura causada pelo relaxamento da musculatura lisa do tecido erétil aumenta o fluxo sanguíneo nos espaços venosos, dando rigidez ao pênis (DRAKE, R. L.; VOGL, W.; MITCHELL, A. W. M., 2005).

Figura 2 - Descrição das estruturas internas do pênis de rato Wistar e humano em corte transversal



**Legenda:** **A:** Fotomicrografia do corte transversal do terço médio do pênis de rato Wistar adulto corado pela técnica histológica tricrômico de Masson (magnificação de 5X em estereoscópio). **B:** Ilustração do histológica do corte transversal do pênis humano.

**Fonte:** Em **A** fotografia do autor em **B** adaptação da ilustração do livro NETTER (2019).

Como agente agressor ao órgão avaliado adotou-se o estresse crônico como mecanismo de desregulação da homeostase do organismo nos indivíduos estudados. O modelo adotado de indução do estresse crônico por contenção tem sido descrito como um método eficaz de ativar o eixo HPA elevando os níveis de corticosterona (de SOUZA et al., 2012; RETANA-MARQUEZ et al., 2003; RIBEIRO et al., 2018). Outros métodos são rotineiramente aplicados, como por exemplo, o choque no pé, o trauma subaquático e o estresse baseado em predadores (SCHÖNER et al., 2017).

O modelo de indução de estresse crônico escolhido se apoia em alguns fatores que apontam para um método eficiente de se atingir as condições desejadas de estresse. A comprovada hiperativação do eixo HPA pela replicação do método (SAMARGHANDIAN et al., 2017; SABER et al., 2018; TRIPATHI et al., 2019), a fácil operacionalidade e o baixo custo,

foram fatores preponderantes para a escolha do modelo de estresse por imobilização neste trabalho.

A indução de estresse por imobilização talvez seja um dos métodos que apresente menor viés, pois a manipulação e complexidade da tarefa são mínimas, diferente dos outros métodos que dependem de maior interferência do pesquisador.

O que se observa é que estudos no qual avaliam as consequências do estresse crônico nos indivíduos tem demonstrado consequências na ereção, seja por aumento de fatores inflamatórios (SAHIN et al., 2017) ou por alterações na composição de tecido erétil presente nos corpos cavernosos (RIBEIRO et al., 2019; de SOUZA et al., 2012).

O estresse crônico, como demonstrado no estudo de Sahin e colaboradores (2017) alterou prejudicialmente as respostas de relaxamento neurogênica e dependentes do endotélio, reduziu a expressão de óxido nítrico, reduziu os níveis de testosterona, aumentou o nível de corticosterona, TNF- $\alpha$  entre outros fatores inflamatórios. Tais condições encontradas foram melhoradas após o uso de um inibidor de TNF- $\alpha$  administrados nos animais. Essas alterações encontradas no estudo indicam a capacidade deletéria do estresse crônico em gerar fatores lesivos aos tecidos eréteis do pênis conduzindo a um ambiente propício para disfunção erétil.

Tendo em vista as correlações supracitadas, busca-se compreender as preferências alimentares em situação de estresse crônico, assim como, investigar se a preferência dietética pelo tipo *comfort food* poderia atenuar os fatores deletérios do estresse crônico na morfologia do pênis e bexiga de ratos Wistar adultos ou ser duplamente danoso.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Geral

Avaliar os efeitos do estresse crônico na preferência alimentar e os efeitos destes na morfologia do pênis de ratos Wistar adultos por métodos morfométricos.

### 1.2. Específicos

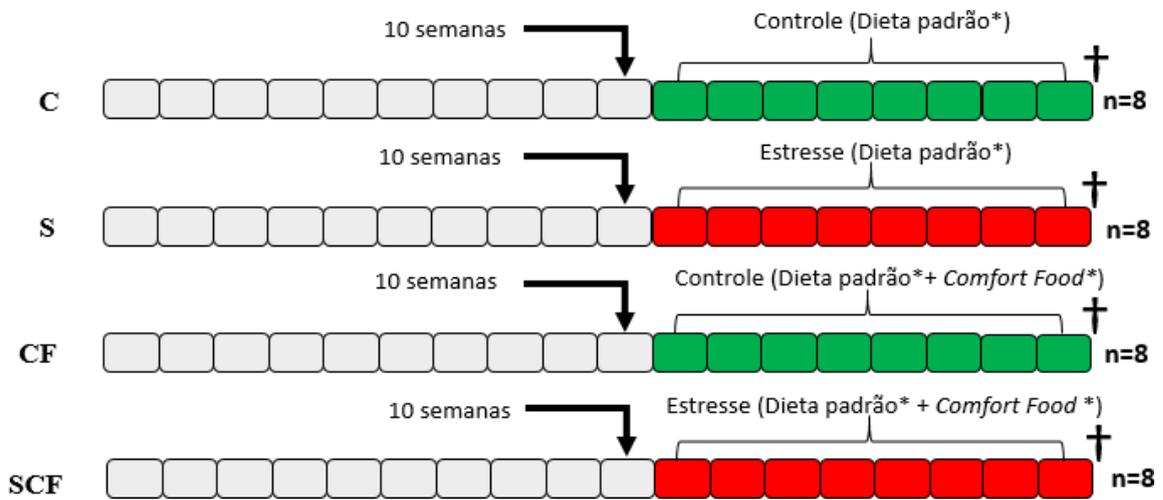
- a) Avaliar o consumo calórico dos indivíduos estressados e não estressados com ou sem acesso à *comfort food*;
- b) Avaliar a preferência alimentar dos indivíduos estressados e não estressados com ou sem acesso à *comfort food*;
- c) Avaliar a área total do pênis em indivíduos com ou sem acesso à *comfort food*;
- d) Avaliar a área do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea em indivíduos com ou sem acesso à *comfort food*;
- e) Avaliar a área da túnica albugínea do corpo cavernoso em indivíduos com ou sem acesso à *comfort food*;
- f) Avaliar a densidade de tecido conjuntivo no corpo cavernoso em indivíduos com ou sem acesso à *comfort food*;
- g) Avaliar a densidade de músculo liso no corpo cavernoso em indivíduos com ou sem acesso à *comfort food*;
- h) Avaliar por método morfométrico a densidade de espaço sinusóide no corpo cavernoso do pênis em indivíduos com ou sem acesso à *comfort food*;

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 32 ratos Wistar adultos para este experimento. Todos os animais foram mantidos em biotério, submetidos a um ambiente com temperatura de  $22 \pm 1$  °C, sob controle de ciclo claro/escuro de 12h (luz artificial de 7:00 as 19:00 horas). Os procedimentos foram realizados na Unidade de Pesquisa Urogenital da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) conforme as orientações convencionais destinadas a pesquisa com experimentação animal. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, sob o número 004/2019, presente no anexo A desta tese.

Os ratos foram divididos em quatro grupos experimentais: controle com dieta padrão (C, n=8); estresse com dieta padrão (S, n=8); controle com dieta padrão + *comfort food* (CF, n=8) e estresse com dieta padrão + *comfort food* (SCF, n=8). A figura 3 representa a distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais. O controle da ingestão alimentar dos animais foi realizado diariamente, onde ambas as dietas (padrão e *comfort food*) foram pesadas antes e após o consumo em balança de precisão, sendo ofertado 50 g de ração padrão (Nuvilab CR-1, Quimtia, Colombo, Brasil), por cada animal presente na caixa em todos os grupos, assim como, de maneira simultânea, ofertado 30g de cereal *Froot Loops* (Kellogg Brazil, São Paulo, Brasil), alimento do tipo *comfort food*, por cada animal presente na caixa nos grupos CF e SCF. Os animais do grupo S e SCF foram submetidos ao protocolo de estresse crônico por restrição de movimento (MARCHON et al., 2018; de SOUZA et al., 2012).

Figura 3 - Divisão dos animais controles e estressados nos diferentes grupos experimentais



Legenda: **C:** Grupo controle com dieta padrão; **S:** Grupo estresse com dieta padrão; **CF:** Grupo controle com dieta padrão mais *comfort food*; **SCF:** Grupo estresse com dieta padrão mais *comfort food*. †: Momento da eutanásia. \*: Os grupos S e SCF durante o protocolo de indução de estresse (duas horas diariamente) eram privados de água e alimento. Os grupos C e CF também foram privados de água e alimento no mesmo período.

**Nota:** Ambos os grupos iniciaram o experimento quando atingiram dez semanas de idade.

**Fonte:** O autor, 2023.

## 2.1 Modelo de indução de estresse crônico

Os animais dos grupos submetidos ao estresse crônico (S e SCF) ficaram restritos à movimentação em tubos de PVC (Policloreto de Vinila), mantendo os ratos imóveis, por duas horas diariamente, durante 8 semanas, sempre no período noturno. Os tubos são fechados em suas extremidades, mas apresentam pequenas perfurações que permitem a ventilação (de SOUZA et al., 2012; RETANA-MARQUEZ et al., 2003; RIBEIRO et al., 2018). Estes tubos foram ajustados conforme o tamanho do animal, possuindo três diferentes tamanhos de diâmetro interno: 40 mm (tubo1), 50 mm (tubo2) e 75 mm (tubo3), como é demonstrado na Figura 4. Os tubos foram trocados conforme crescimento dos animais garantindo constante imobilização. A troca somente foi realizada quando as dimensões do animal foram menores que a luz do tubo, então, realizou-se a imobilização do animal no tubo seguinte de maior diâmetro, ou seja, do tubo 1 para o tubo 2 e do tubo 2 para o tubo 3. Sendo observado como critério apenas as dimensões dos animais em relação ao tubo.

Figura 4 - Tubos de PVC opacos utilizados para indução do estresse crônico



**Legenda:** Tubos de PVC opacos utilizados para restrição de movimento dos ratos. Três tamanhos de tubos foram utilizados de acordo com o tamanho do animal, classificados na imagem, da esquerda para a direita, como: tubo 1 (1), tubo 2 (2) e tubo 3 (3). Nas laterais da imagem estão os tubos com vista dos furos para ventilação, enquanto o tubo centralizado demonstra a vista da perfuração para passagem da cauda do animal.

**Fonte:** O autor, 2023.

Todos os animais deste experimento foram mantidos em caixas distribuídos numericamente de maneira igual sendo acondicionados em biotério. Os animais submetidos ao estresse crônico (grupos S e SCF) foram privados da oferta de alimento e água durante a indução do estresse. Assim como os animais controles (grupos C e CF) eram também privados de alimento e água por duas horas diariamente durante o período em que os animais estressados eram submetidos ao estresse crônico. Os animais dos grupos S e SCF foram submetidos ao estresse crônico a partir de dez semanas de idade, assim como, os grupos controles (C e CF) iniciaram o experimento no mesmo período da vida.

## 2.2 Dieta

Para avaliação do estudo foram utilizados dois tipos de alimentos distintos. Como alimento do tipo controle foi utilizado a ração padrão para animais de experimentação (Nuvilab CR-1, Quimtia, Colombo, Brasil) que corresponde a uma dieta balanceada para os roedores.

Para a aplicação da dieta do tipo *comfort food* foi escolhido o cereal matinal *Froot Loops* (Kellogg Brasil, São Paulo, Brasil). O alimento escolhido possui consistência sólida, de tamanho que permite permanecer sobre a grade que sobrepõe a caixa em que os animais são

acondicionados sem que caia no interior da caixa. O alimento froot loops é encontrado facilmente em supermercados por todo mundo, é feito de maneira padronizada e possui um aspecto chamativo por ser colorido e aromatizado. Também é rico em açúcar e pobre em fibras alimentares. A composição nutricional dos dois alimentos está detalhada na tabela 1.

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas experimentais

		<b>Ração padrão (Nuvilab CR-1)</b>	<b><i>Comfort food</i> (Froot Loops)</b>
<b>Energia</b>	Kcal/100g	295Kcal	377kcal
<b>Carboidratos</b>	g/100g	40.5g	88.8g
	%	55%	94%
<b>Proteínas</b>	g/100g	16.2g	4.7g
	%	22%	5%
<b>Gorduras totais</b>	g/100g	1.5g	0.7g
	%	4,5%	1,7%
<b>Fibras alimentares</b>	g/100g	7.0g	2.1g
<b>Sódio</b>	mg/100g	0.27mg	405mg

**Fonte:** Dados fornecidos pelo produtor (Nuvilab CR-1, Quimtia, Colombo, Brazil) e TACO – Tabela brasileira de composição de alimentos.

### 2.3 Eutanásia

Foi realizada a eutanásia em todos os ratos ao completarem 18 semanas de idade, para coleta e avaliação do pênis. Todos os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica de Isoflurano 2% (BioChimico, Itatiaia, Brasil) em câmara de indução.

## 2.4 Teste de glicemia capilar

Foi realizado o teste de glicemia capilar, antes e ao final do experimento (10 semanas e 18 semanas). Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas e a glicemia capilar foi aferida com glicosímetro apropriado (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil). O sangue foi coletado por meio de uma pequena incisão na cauda com auxílio de uma agulha.

## 2.5 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 (pH 7,2 - 7,4) durante 24-48 horas. O material foi submetido às técnicas histológicas de rotina, isto é, desidratado em álcool e clarificado em xilol para posterior inclusão em parafina. Após a inclusão, foram realizados cortes histológicos com 5 µm de espessura e espaçamento de 50 µm entre cada corte. Os cortes histológicos foram corados pela técnica de hematoxilina & eosina para verificar a integridade dos tecidos e para as avaliações foram utilizado as técnicas de coloração pelo vermelho de picrosírius e pelo tricrômico de Masson.

## 2.6 Morfometria

Todas as análises morfológicas foram realizadas através de fotomicrografias capturadas com câmera digital (DP70, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada no microscópio (BX51, Olympus). Para cada análise, foram realizadas 25 fotomicrografias de cinco cortes distintos, ou seja, cinco fotomicrografias para cada corte. As fotomicrografias foram capturadas e salvas sob as mesmas condições. Para as análises morfométricas foi utilizado o *software ImageJ 1.53K* (National Institute of Health, Bethesda, EUA).

No pênis foram analisados os seguintes parâmetros: 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 músculo liso, tecido conjuntivo e espaço sinusoidal do corpo cavernoso.

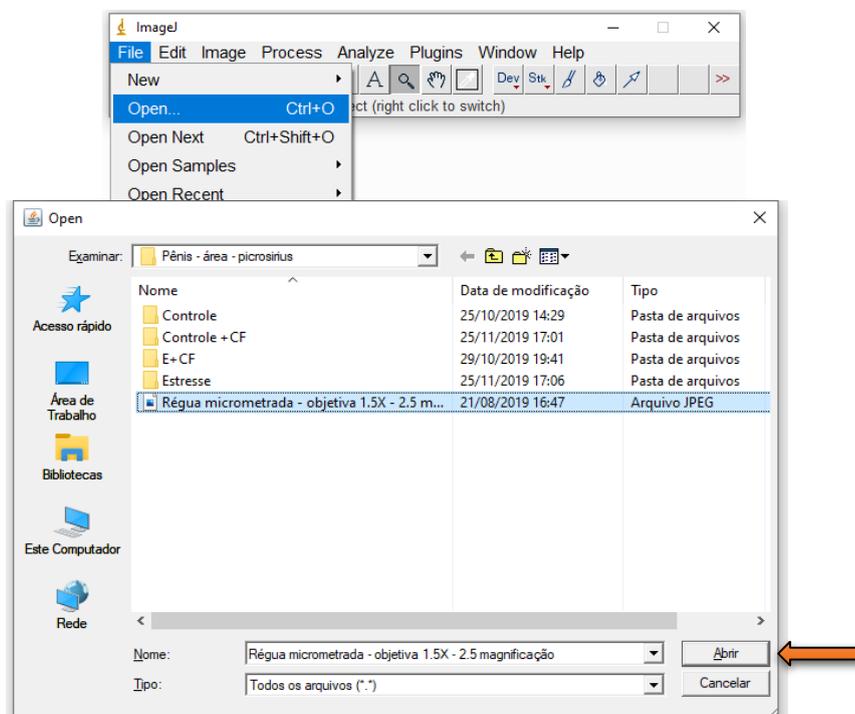
### 2.6.1 Análise da área do corte transversal do pênis

Para a análise das áreas dos cortes transversais do terço médio do pênis, foram utilizadas as fotomicrografias das lâminas coradas com o vermelho de picrossirius. Para demarcar as áreas dos cortes transversais será utilizada a ferramenta *Free hand* do software *ImageJ* 1.53K. Por meio desta ferramenta foram avaliadas a área total do pênis e em seguida as áreas do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea (FELIX-PATRICIO et al., 2015).

Para as análises no software *ImageJ* 1.53K conforme foram realizadas são necessários os seguintes passos, descritos a seguir:

- 1º - Abrir o programa *ImageJ* 1.53K;
- 2º - No menu “File” clicar na opção “Open” (figura 5);
- 3º - Selecionar a fotomicrografia da régua micrometrada realizada nas mesmas condições das imagens a serem analisadas, ou seja, mesmo microscópio e com a mesma objetiva (figura 5).

Figura 5 – Seleção da fotomicrografia com a régua micrometrada para calibração do programa *Image J*

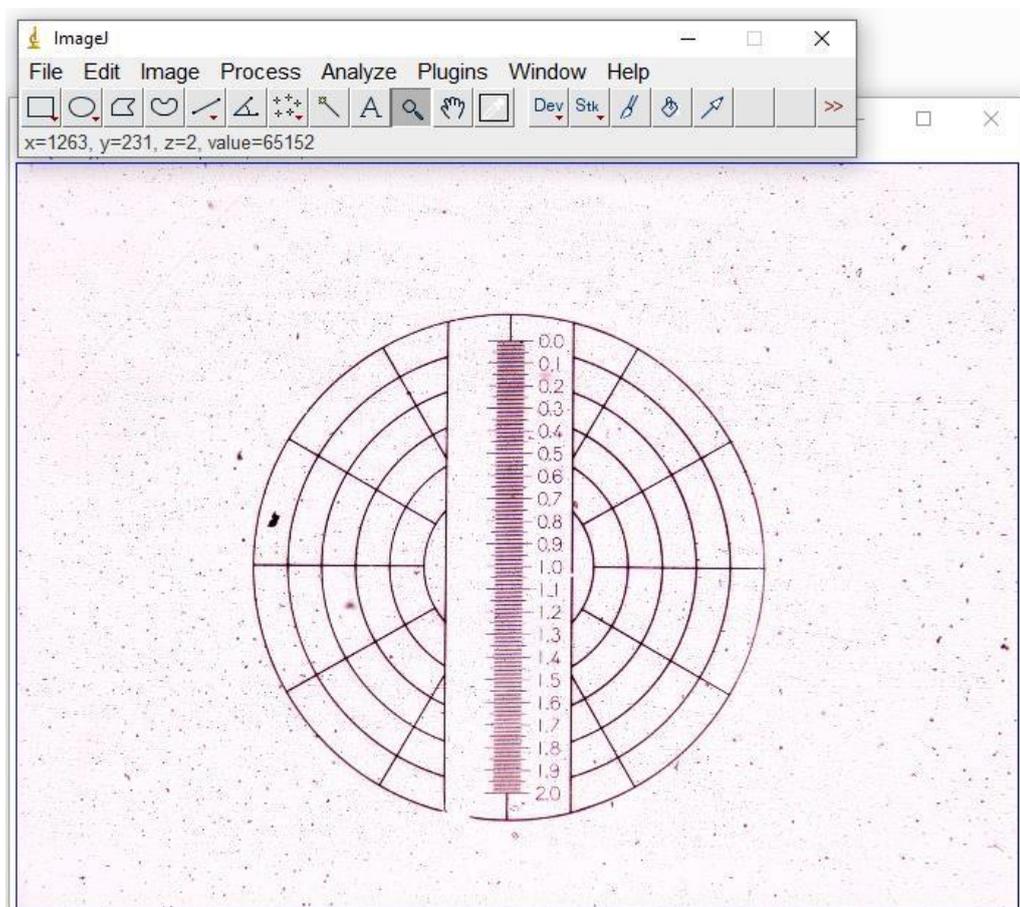


**Legenda:** Demonstração dos passos a seguir para selecionar a fotomicrografia da régua micrometrada utilizada para realiza a calibração do *software*. No menu “File” clicar no botão “Open” (em azul), selecionar fotomicrografia da régua micrometrada e clicar no botão “Abrir” (seta laranja).

**Fonte:** O autor, 2023.

4º - realizar a mensuração de um tamanho conhecido na imagem da régua micrometrada (figura 6) com o auxílio da ferramenta “Straight”. Pode-se também utilizar o auxílio da ferramenta “Magnifying glass” (figura 7) para aproximar a imagem e facilitar a mensuração. Para mensurar basta pressionar a tecla “m” e uma caixa diálogo com o valor da distância em pixel aparece (figura 8).

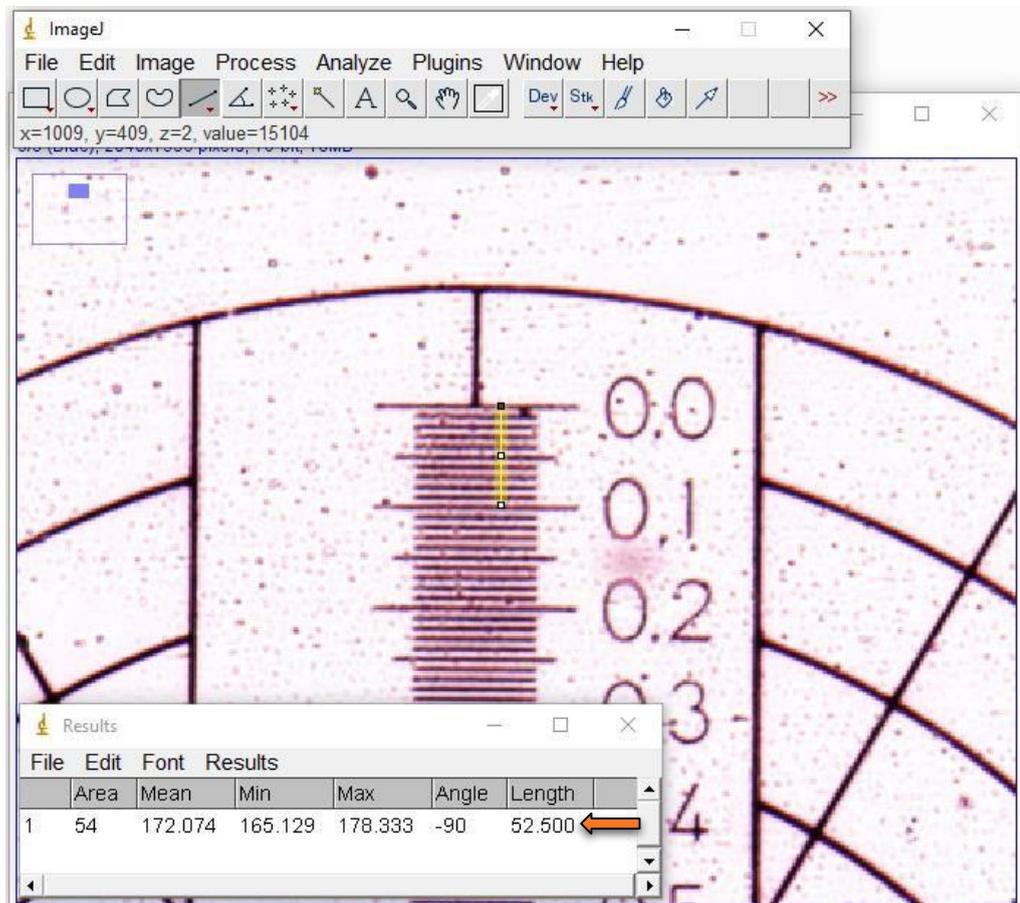
Figura 6 – Fotomicrografia da régua em micrômetros para calibração da distância conhecida em pixels



**Legenda:** Fotomicrografia da régua micrometrada utilizada para mensurar o valor em pixel de uma distância conhecida. A fotomicrografia é realizada nas mesmas condições em que as lâminas são fotografadas. Quando o aumento é pequeno, pode-se utilizar a ferramenta “Magnifying glass” (selecionada na imagem) para aproximar e facilitar a mensuração.

**Fonte:** O autor, 2023.

Figura 7 – Mensuração de uma distância conhecida na régua micrometrada após utilização da ferramenta “Magnifying glass” para aproximar a imagem

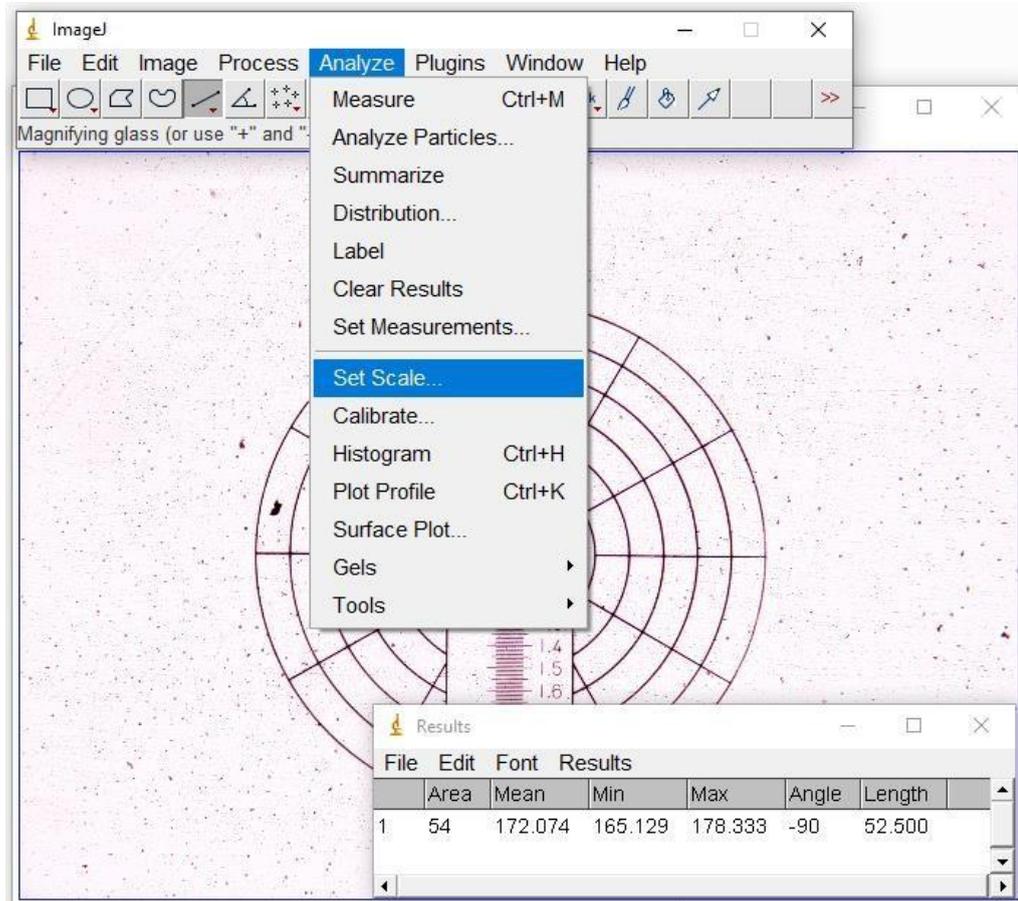


**Legenda:** Fotomicrografia da régua micrometrada após utilização da ferramenta “Magnifying glass” para aproximar a imagem e facilitar a mensuração em pixel de uma distância conhecida em micrômetros. A seta em laranja representa o valor em pixel encontrado pela distância mensurada com a ferramenta “Straight”, representada pela linha em amarelo.

**Fonte:** O autor, 2023.

5° - Para calibrar é preciso acessar o menu “Analyze” e depois a opção “Set Scale” (figura 8). Na caixa de diálogo que se abrirá deve-se preencher os campos “Distance in pixels” – com o valor em pixel encontrado na mensuração da imagem micrometrada – “Know distance” – com o valor em micrômetro em que a mensuração representa na régua – “Pixel aspect ratio” – manter em 1.0 – “Unit of length” – informar a unidade de medida, no caso micrômetro ( $\mu\text{m}$ ) – marcar a opção “Global”, para manter a configuração para as demais análises e clicar em “Ok”. Esses passos estão representados na figura 9.

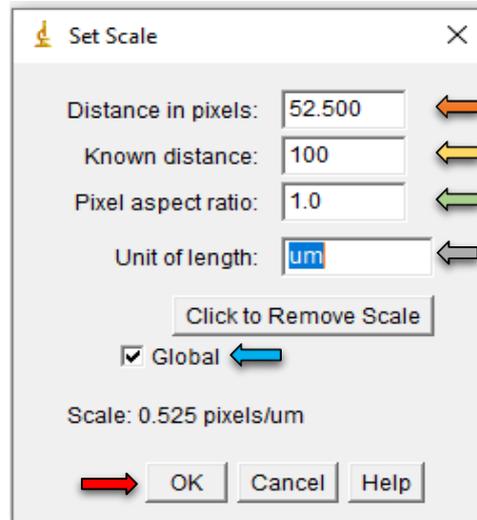
Figura 8 – Abertura da caixa de diálogo para calibração do programa *Image J*



**Legenda:** Representação dos passos realizados para abrir a caixa de diálogo para realizar a calibração do *software*.  
Acesso ao menu “Analyze” e seleção da opção “Set Scale”, ambas destacadas em azul.

**Fonte:** O autor, 2023.

Figura 9 – Preenchimento dos campos para calibração do programa *Image J*



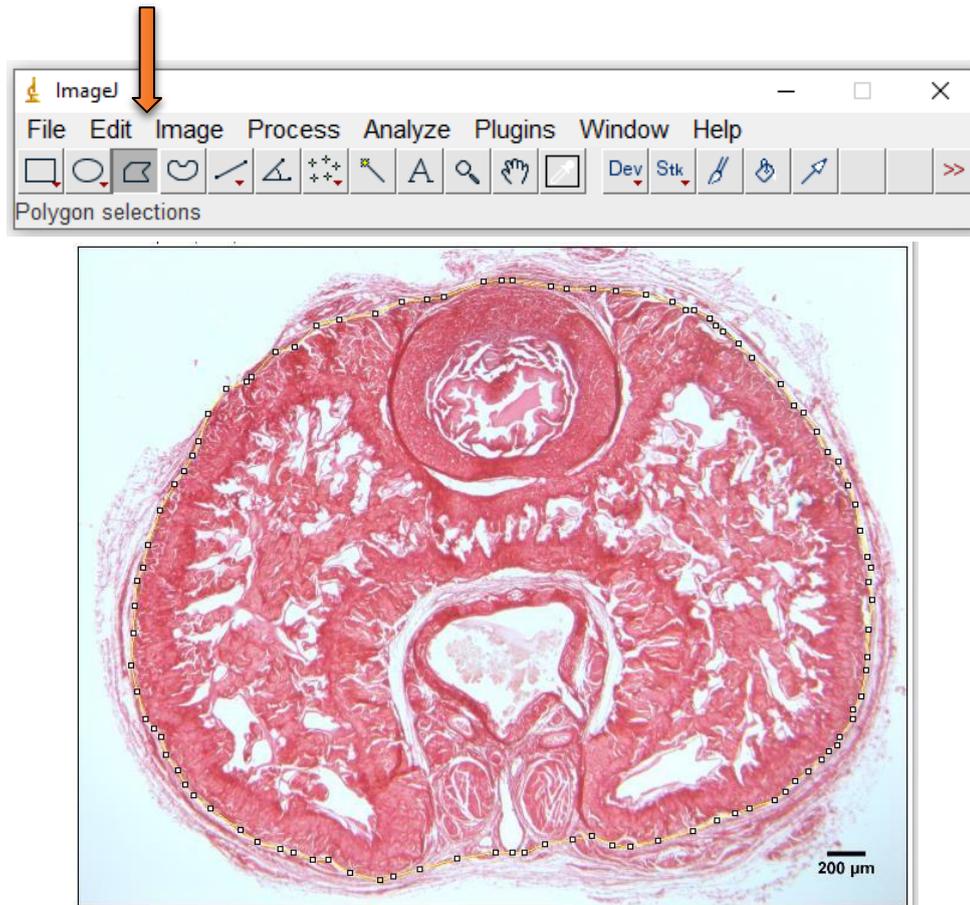
**Legenda:** Caixa de diálogo com os campos para preenchimento para realizar a calibração do programa *Image J*. Na seta laranja o valor em pixel encontrado na mensuração da régua micrometrada. Na seta amarela a distância conhecida da mensuração conhecida na régua. Na seta verde a razão em pixel. Na seta cinza a unidade de medida utilizada. Na seta azul marca-se a opção de manter as configurações para as demais análises e por último, na seta vermelha confirma-se as alterações.

**Fonte:** O autor, 2023.

Após a calibração foram utilizadas 5 fotomicrografias, por cada animal, dos cortes transversais do pênis corados pela técnica de *Picrosirius red* para a avaliação das áreas das estruturas do pênis.

Para isso, após a abertura da imagem pelo caminho “File” e opção “Open”, foram realizadas as mensurações com o auxílio da ferramenta “Polygon selections”. Feita então a mensuração da área total do pênis (figura 10), área do corpo cavernoso com a túnica albugínea (figura 11), área do corpo cavernoso sem a túnica albugínea (figura 12).

Figura 10 – Mensuração da área total do pênis após calibração do programa *Image J*



**Legenda:** Utilização da ferramenta “Polygon selections” (seta laranja), que com múltiplos cliques permite maior precisão ao mensurar estruturas que não são retilíneas dando maior exatidão nas mensurações. A área mensurada está representada pela linha amarela.

**Fonte:** O autor, 2023.

Figura 11 – Mensuração da área do CC com a TA



**Legenda:** Utilização da ferramenta “Polygon selections” (seta laranja), que com múltiplos cliques permite maior precisão ao mensurar estruturas que não são retilíneas dando maior exatidão nas mensurações. A área mensurada está representada pela linha amarela. **CC:** corpo cavernoso; **TA:** túnica albugínea.

**Fonte:** O autor, 2023.

Figura 12 – Mensuração da área do CC sem a TA



**Legenda:** Utilização da ferramenta “Polygon selections” (seta laranja), que com múltiplos cliques permite maior precisão ao mensurar estruturas que não são retilíneas dando maior exatidão nas mensurações. A área mensurada está representada pela linha amarela. **CC:** corpo cavernoso; **TA:** túnica albugínea.

**Fonte:** O autor, 2023.

Para análise da área da túnica albugínea foi realizada a subtração do valor da mensuração da área do corpo cavernoso com a túnica albugínea e a área do corpo cavernoso sem a túnica albugínea, representada na figura 13.

Figura 13 – Mensuração da TA por meio da subtração das mensurações das áreas do CC com e sem TA

5.730.347  $\mu\text{m}^2$



4.012.200  $\mu\text{m}^2$



1.718.147  $\mu\text{m}^2$



**Legenda:** Imagem em **A** demonstrando a mensuração da área do corpo cavernoso com a túnica albugínea. Em **B** mensuração da área do corpo cavernoso sem a túnica albugínea.

Na parte superior da imagem os valores das duas mensurações são subtraídas para se obter o valor da túnica albugínea. **CC:** corpo cavernoso; **TA:** túnica albugínea.

**Fonte:** O autor, 2023.

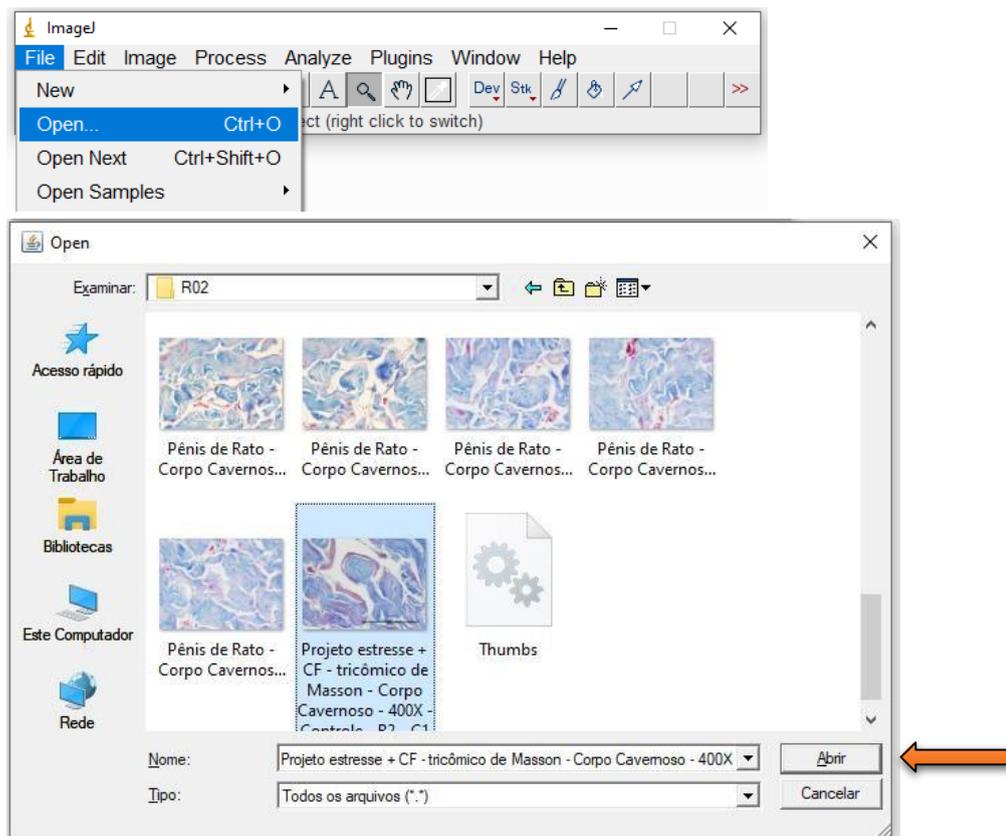
## 2.6.2 Análise de densidade de superfície (Sv)

Para avaliação do corpo cavernoso do pênis foram analisadas as Sv do tecido conjuntivo, Sv de músculo liso e Sv de espaço sinusóide dos corpos cavernosos. Para essas análises foram utilizadas lâminas coradas pela técnica de tricômico de Masson. A densidade de cada uma dessas estruturas foi expressa em porcentagem, obtida pelo método de contagem de pontos.

Para aplicação do método da contagem de pontos foram realizados os seguintes passos:

- 1º - Abrir o programa *ImageJ* 1.53K;
- 2º - No menu “File” clicar na opção “Open” (figura 14);
- 3º - Localizar a pasta e selecionar a fotomicrografia a ser analisada. Após a seleção clicar no botão “Abrir” (figura 14).

Figura 14 – Seleção da fotomicrografia para análise da Sv do corpo cavernoso

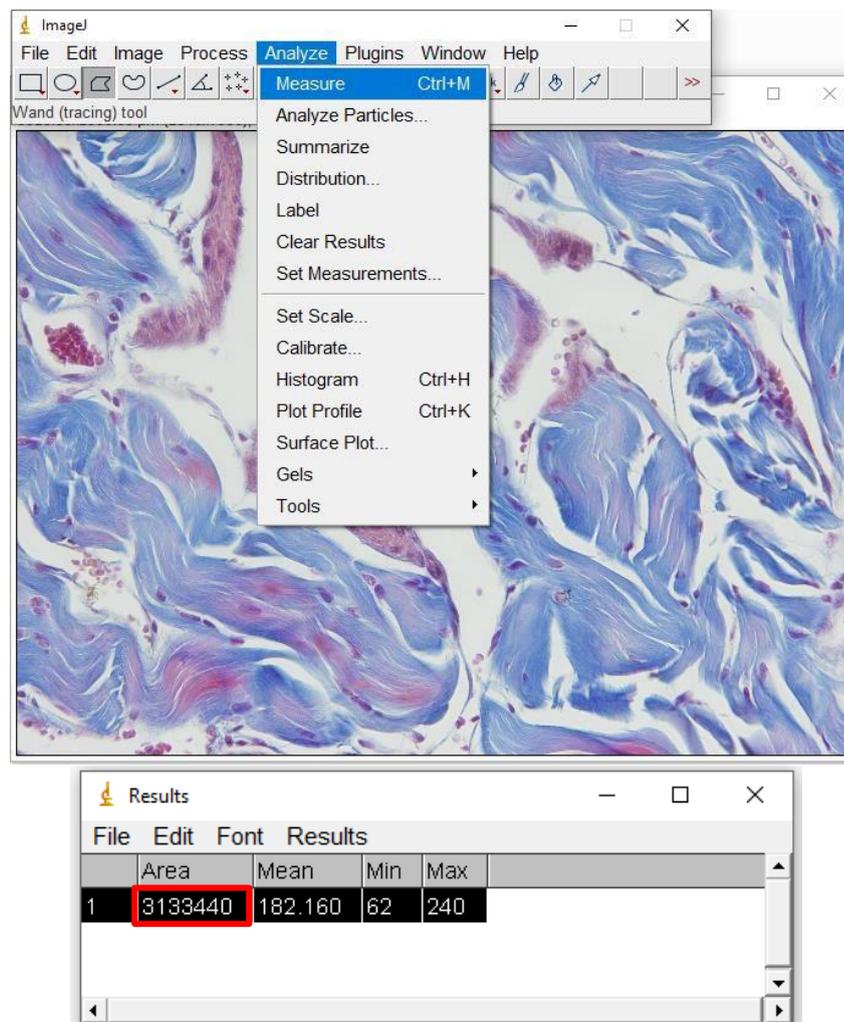


**Legenda:** Demonstração dos passos para seleção da fotomicrografia para avaliação das estruturas do corpo cavernoso. No menu “File” clicar no botão “Open” (em azul), selecionar fotomicrografia para análise e clicar no botão “Abrir” (seta laranja).

**Fonte:** O autor, 2023.

4º - Mensurar a área total da imagem em pixel acessando o menu “Analyze” e clicando na opção “Measure”, ou por meio da tecla de atalho Ctrl + m (figura 15);

Figura 15 – Mensuração da área total da imagem em pixel no programa *ImageJ*

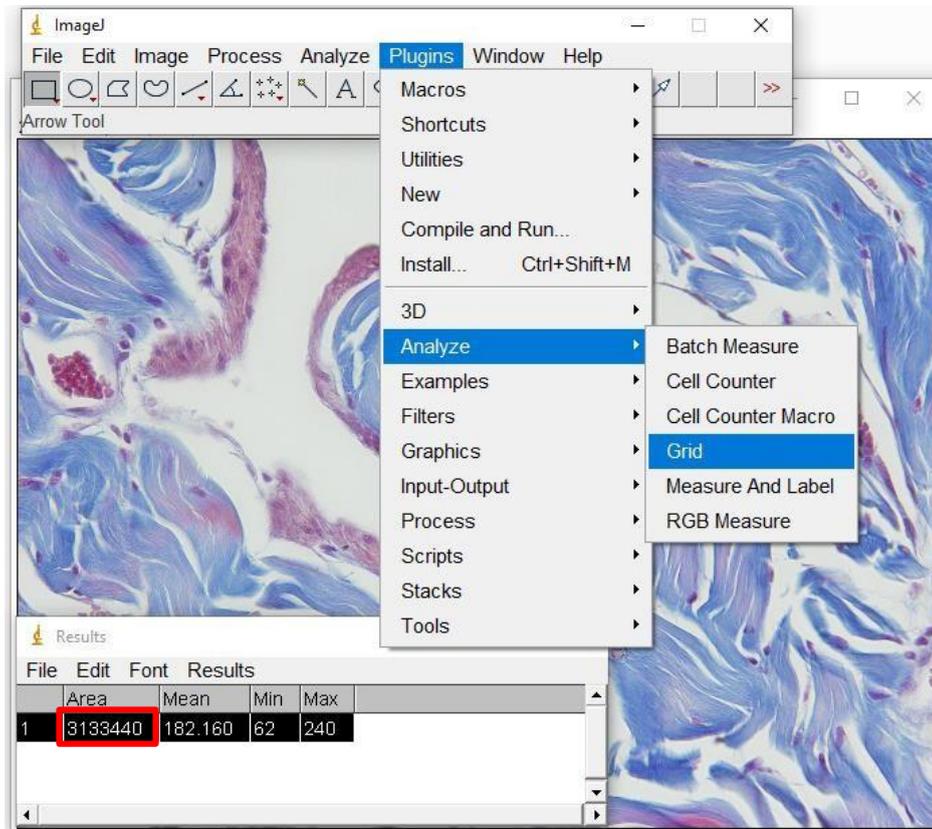


**Legenda:** Demonstração dos passos para mensurar a área total da fotomicrografia. No menu “Analyze” clicar no botão “Measure” (em azul), ou por meio da tecla de atalho “Ctrl + m”. Em vermelho resultado da mensuração.

**Fonte:** O autor, 2023.

5º - Após a mensuração da área da imagem acessar o menu “Plugins” na opção “Analyze” e clicar no botão “Grid” (figura 16).

Figura 16 – Distribuição da grade de 99 pontos sobre a fotomicrografia.

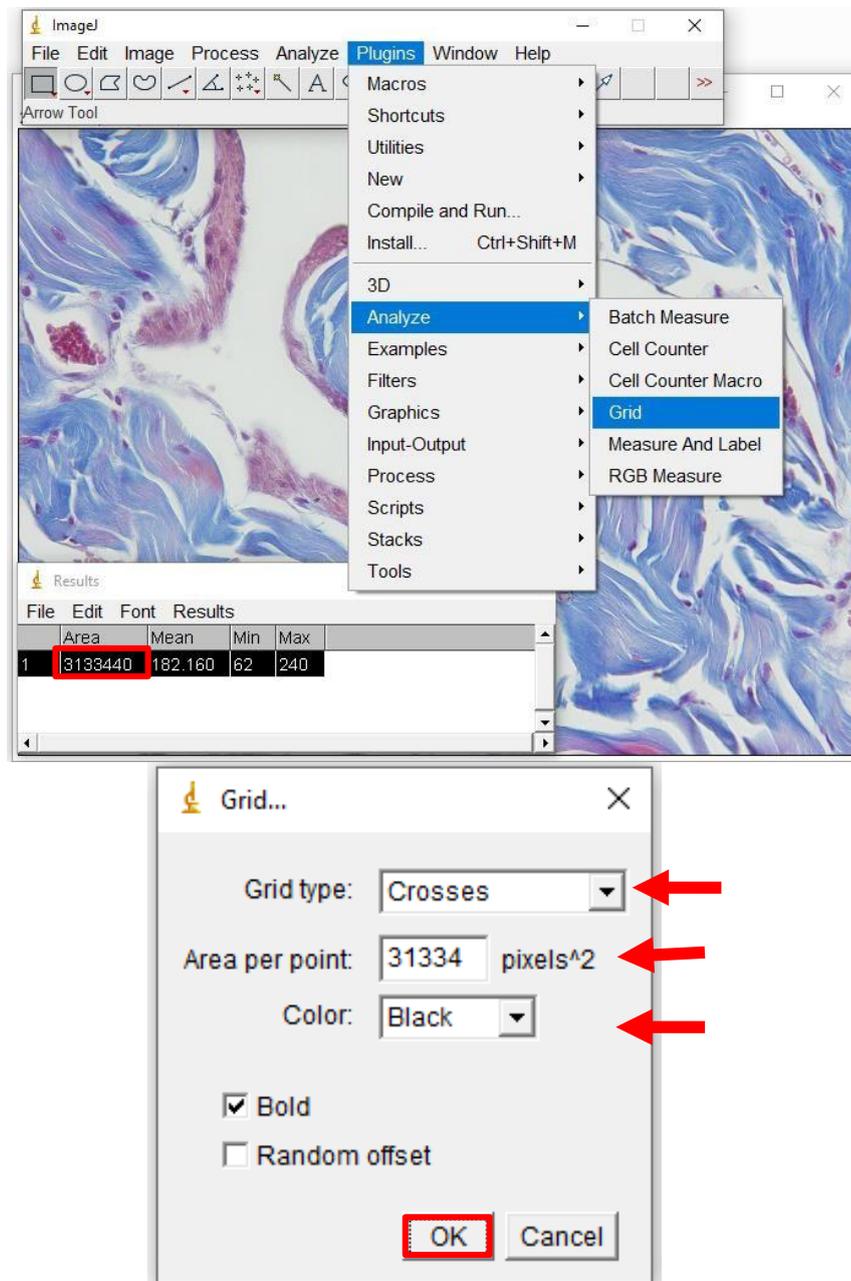


**Legenda:** Demonstração dos passos para abrir a caixa de diálogo e sobrepor a grade de 99 cruzeiros sobre a fotomicrografia. No menu “*Plugins*” acessar a opção “*Analyze*” e clicar no botão “*Grid*” (em azul). Em vermelho está o resultado da mensuração já realizada.

**Fonte:** O autor, 2023.

6º - Ao realizar o passo anterior preencher a caixa de diálogo que irá abrir após clicar no botão “*Grid*”. Já na caixa de diálogo, na opção “*Grid type*” escolher o tipo de grade “*Crosses*”. Na opção “*Area per point*” inserir o valor da área da imagem mensurado no passo 4º. Na opção “*Color*” escolher a cor que facilite a visualização da estrutura e clicar em confirmar no botão “*Ok*” (figura 17).

Figura 17 – Preenchimento da caixa de diálogo para configurar grade de pontos de sobrepor a fotomicrografia



**Legenda:** Preenchimento da caixa de diálogo “Grid” para configuração da grade de sobrepor as fotomicrografias. No menu “*Plugins*” na opção “Analyze” clicar no botão “Grid” (em azul). Já na caixa de diálogo, na opção “Grid type” escolher o tipo de grade “Crosses”. Na opção “Area per point” inserir o valor da área da imagem mensurado no 4º passo. Na opção “Color” escolher a cor que facilite a visualização da estrutura e clicar em confirmar no botão “Ok” (setas em vermelho).

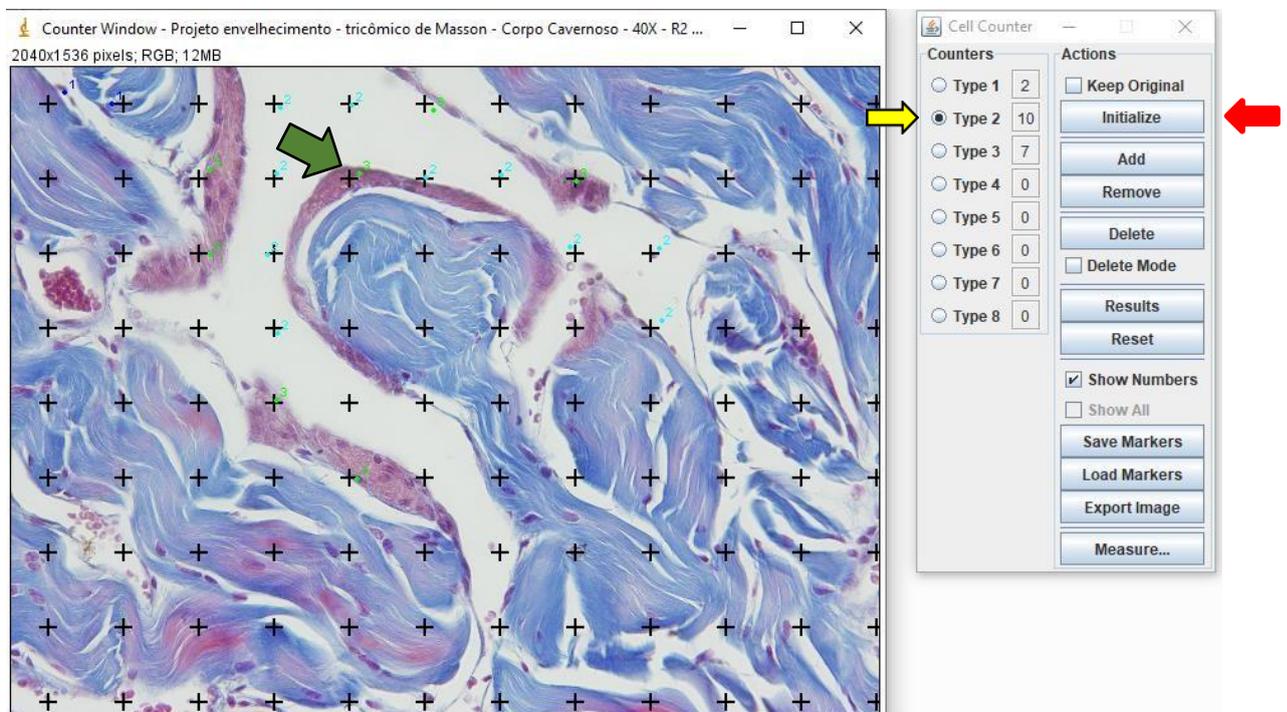
**Fonte:** O autor, 2023.

7º - Após a configuração da grade de sobrepor, utilizou-se como auxílio para contagem da estruturas a ferramenta “Cell Counter”. Esse *plugin* funciona como um contador que permite

contar diferentes estruturas em uma mesma imagem alternando a seleção nas opções de tipo descritas no *plugin* como “Type 1”, Type 2” e assim por sequência até suprir a necessidade de tipos de contadores diferentes que satisfaça a análise. No nosso caso, utilizamos o “Type 1”, “Type 2” e o “Type 3” (figura 18), pois avaliamos três tipos de estruturas diferentes na mesma imagem. Para isso o acesso se dá pelo menu “*Plugins*”, opção “*Analyze*” e botão “*Cell Counter*”. Após a abertura do *plugin*, clicar no botão “*Initialize*” e definir o contador para cada estrutura a ser analisada. As estruturas são marcadas por cores diferentes nas fotomicrografias após um clique sobre a imagem. Essa contagem foi realizada a cada vez que as cruces da grade sobreposta a fotomicrografia tocou uma das estruturas alvo do estudo.

Após a análise das fotomicrografias, os números de pontos que tocaram as estruturas quantificadas foram expressos em porcentagem. Os resultados obtidos serão considerados como a Sv (densidade de superfície) de cada uma das estruturas analisadas. Os valores encontrados de cada estrutura em cada imagem foram tabulados e as médias de cada animal utilizadas para análise estatística.

Figura 18 - Contagem de pontos utilizando o contador “Cell Counter”



**Legenda:** Fotomicrografia do corpo cavernoso do pênis de rato Wistar corado pela técnica de tricrômico de Masson com aplicação da grade de pontos. Para utilização do contador deve-se clicar no botão “*Initialize*” (seta em vermelho), marcar uma opção de contador (seta em amarelo) e clicar na tela sobre a estrutura avaliada (seta verde).

**Fonte:** O autor, 2023.

## 2.7 Análise estatística

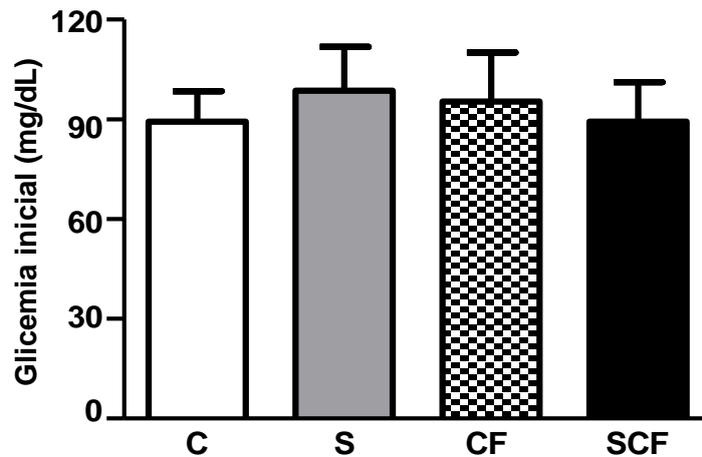
Os valores das médias encontradas nas análises foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Os dados que respeitaram a normalidade na curva de distribuição (paramétricos) foi utilizado a análise de variância one-way (ANOVA) com aplicação do pós-teste de Bonferroni. Para os dados que não respeitaram a normalidade na curva de distribuição (não-paramétricos) foi utilizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Todas as análises foram realizadas com o *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego, EUA). As comparações foram consideradas diferentes quando  $p < 0,05$ . Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Resultados das análises biométricas e bioquímicas

Em relação a análise da glicemia capilar não foi visto diferença entre as mensurações antes e após o período de experimentos, apresentando valor de  $p=0,3701$  e  $p=0,4055$ , respectivamente, conforme pode ser visualizado no gráfico 1 e 2. Já no gráfico 3, onde demonstra a massa corporal dos animais ao final do experimento também não foi visto diferença nas comparações entre os grupos, apresentando valor de  $p=0,8481$ .

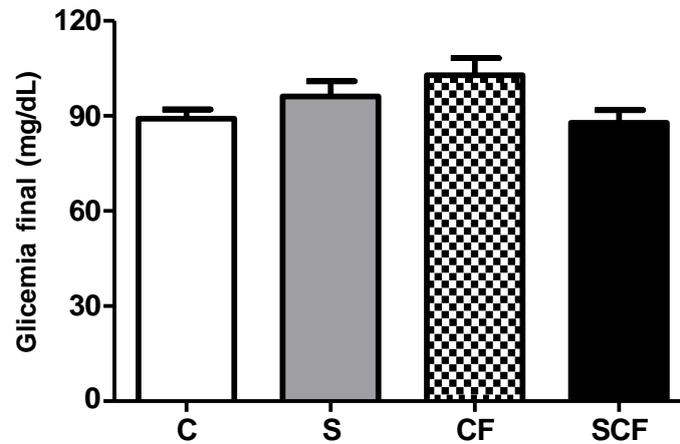
Gráfico 1 – Valores da glicemia antes do período experimental



**Legenda:** **C:** grupo controle com dieta padrão; **S:** grupo estresse com dieta padrão; **CF:** grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; **SCF:** grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*. Não houve diferença estatística. Valor de  $p=0,3701$ .

**Fonte:** O autor, 2023.

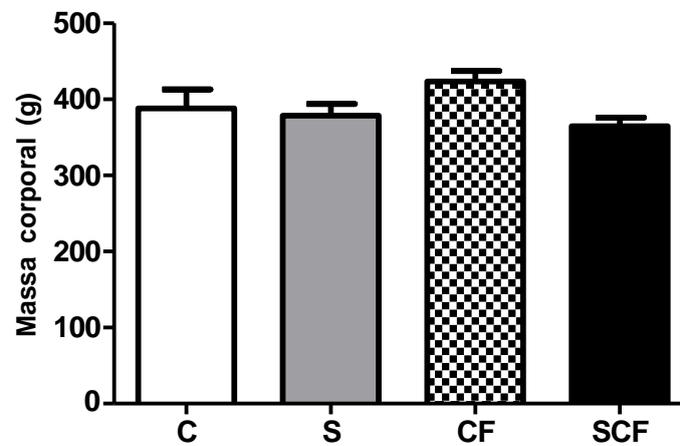
Gráfico 2 – Valores da glicemia após o período experimental



**Legenda:** C: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*. MC: massa corporal. Não houve diferença estatística. Valor de  $p=0,4055$ .

**Fonte:** O autor, 2023.

Gráfico 3 – Valor da massa corporal dos animais após o experimento



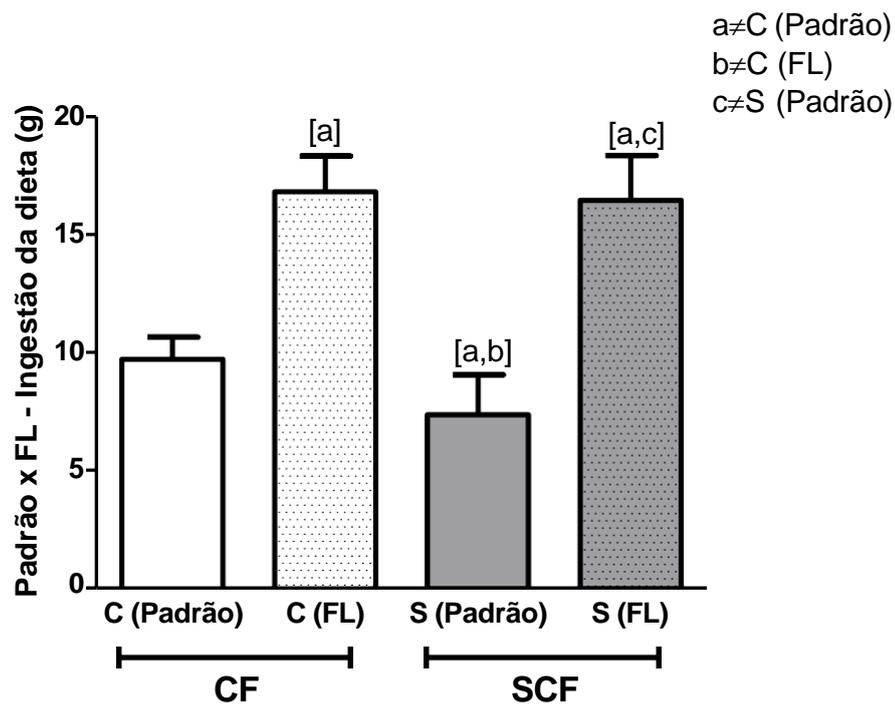
**Legenda:** C: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*. Não houve diferença estatística. Valor de  $p=0,8481$ .

**Fonte:** O autor, 2023.

### 3.2 Resultado das análises de comportamento alimentar

Na comparação da preferência alimentar entre os grupos em que foram ofertados as diferentes dietas (ração padrão e Froot Loops), CF e SCF, foi possível caracterizar uma preferência pelo alimento tipo *comfort food* em ambos os grupos, sendo visto um consumo maior do Froot Loops de 43,23% nos ratos do grupo SCF e uma preferência dos animais pelo cereal Froot Loops de 57,33% no grupo SCF ( $p < 0,0001$ ), como ilustrado no gráfico 4. Ao compararmos a ingestão de Froot Loops entre o grupo CF e SCF é visto um aumento de 18,54% na ingestão do alimento tipo *comfort food* no grupo submetido ao estresse crônico, SCF. Essa diferença foi encontrada por meio das médias da ingestão em gramas diariamente mensuradas.

Gráfico 4 – Preferência alimentar dos animais dos grupos com dieta *comfort food*

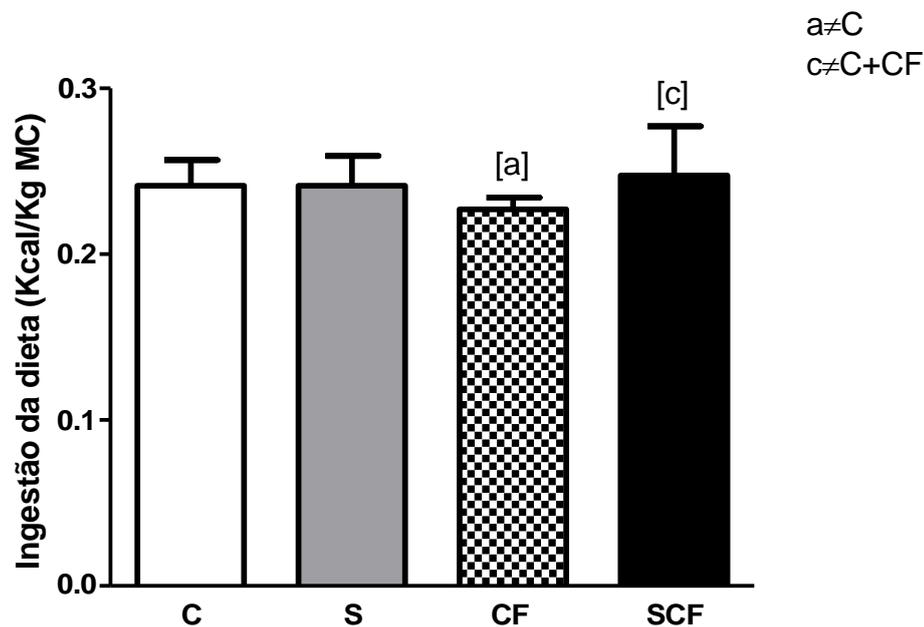


**Legenda:** CF: grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*. **Padrão:** dieta padrão; **FL:** Froot Loops, cereal escolhido como alimento do tipo *comfort food*. a: diferente de C (Padrão). b: diferente de C (FL). c: diferente de S (Padrão). Valor de  $p < 0,0001$ .

**Fonte:** O autor, 2023.

Ao avaliar a ingestão alimentar dos indivíduos em Kcal/kg MC foi visto um aumento no consumo do SCF em 8,24% na comparação com o grupo CF. O grupo CF apresentou redução no consumo em 5,88% ao compararmos com o grupo C ( $p=0,0098$ ). As demais comparações não apresentaram diferença. As configurações estão ilustradas no gráfico 5.

Gráfico 5 – Comparação do consumo energético dos indivíduos por quilograma de massa corporal



**Legenda:** C: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*. a: diferente de C. MC: massa corporal. c: diferente de CF. Valor de  $p=0,0098$ .

**Fonte:** O autor, 2023.

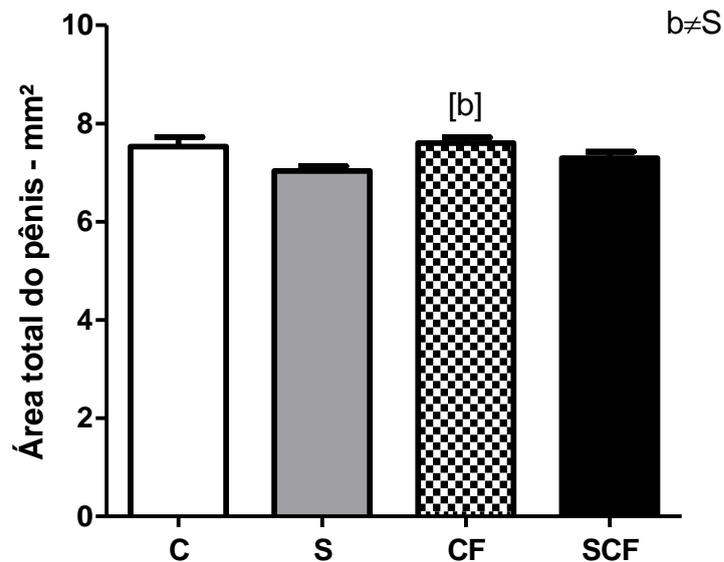
### 3.3 Avaliações morfométricas

#### 3.3.1 Mensuração da área do pênis

Em relação as mensurações da área total do pênis nos diferentes grupos foi visto uma diferença estatística na comparação entre o grupo S e o grupo CF, em que o grupo estressado apresentou uma redução da área total do pênis no ordem de 6,78% em relação ao grupo controle

mais *comfort food*, sendo  $p=0,0183$ . As demais comparações não apresentam diferença estatística. O Gráfico 6 ilustra esta análise.

Gráfico 6 – Comparação entre os grupos experimentais das mensurações da área total do pênis

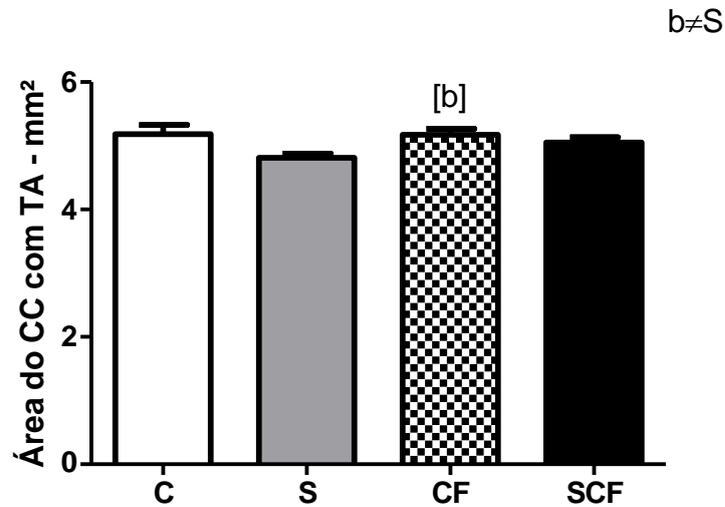


**Legenda:** C: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*. a: diferente de S. Valor de  $p=0,0183$ .

**Fonte:** O autor, 2023.

Similar resultado foi visto na comparação entre os distintos grupos experimentais em relação a área do corpo cavernoso do pênis com a túnica albugínea. O grupo S apresentou redução da área do corpo cavernoso em 6,44% em relação ao grupo CF, com  $p=0,0099$ . As demais comparações acerca da área total do pênis não apresentam diferença estatística. As comparações podem ser vistas no gráfico 7.

Gráfico 7 - Comparação das médias das áreas do CC do pênis com TA



**Legenda:** C: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*. CC: Corpo Cavernoso. TA: Túnica Albugínea. **b**: diferente de S. Valor de  $p=0,0099$ .

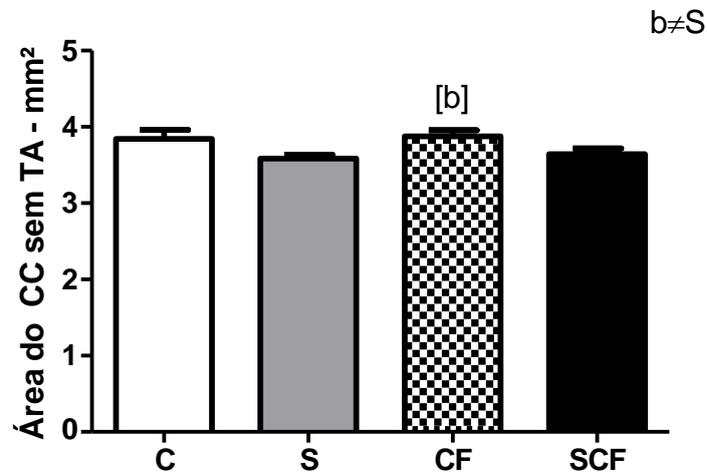
**Fonte:** O autor, 2023.

Já no que tange a área do corpo cavernoso sem túnica albugínea foi visto uma semelhante redução de 7,53% no grupo S em relação ao grupo CF, sendo  $p=0,0378$ . As demais comparações das médias das áreas do corpo cavernoso sem túnica albugínea não apresentaram diferença. Os resultados foram apresentados no gráfico 8.

Na comparação das médias da área da túnica albugínea do corpo cavernoso não foi visto diferença estatística sendo o valor de  $p=0,2725$ . O gráfico 9 ilustra o resultado das comparações estatísticas mencionadas.

As comparações estatísticas realizadas neste tópico estão ilustradas nas fotografias histológicas apresentadas na figura 19.

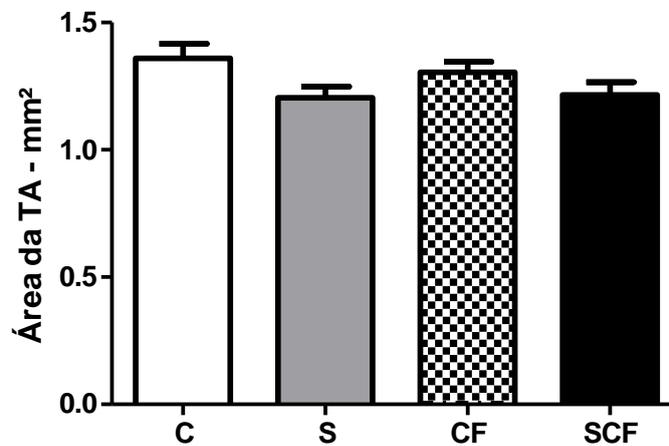
Gráfico 8 – Comparação da área do CC sem TA dos grupos experimentais



**Legenda:** C: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*. TA: túnica albugínea. CC: corpo cavernoso. **b:** diferente de S. Valor de  $p=0,0378$ .

**Fonte:** O autor, 2023.

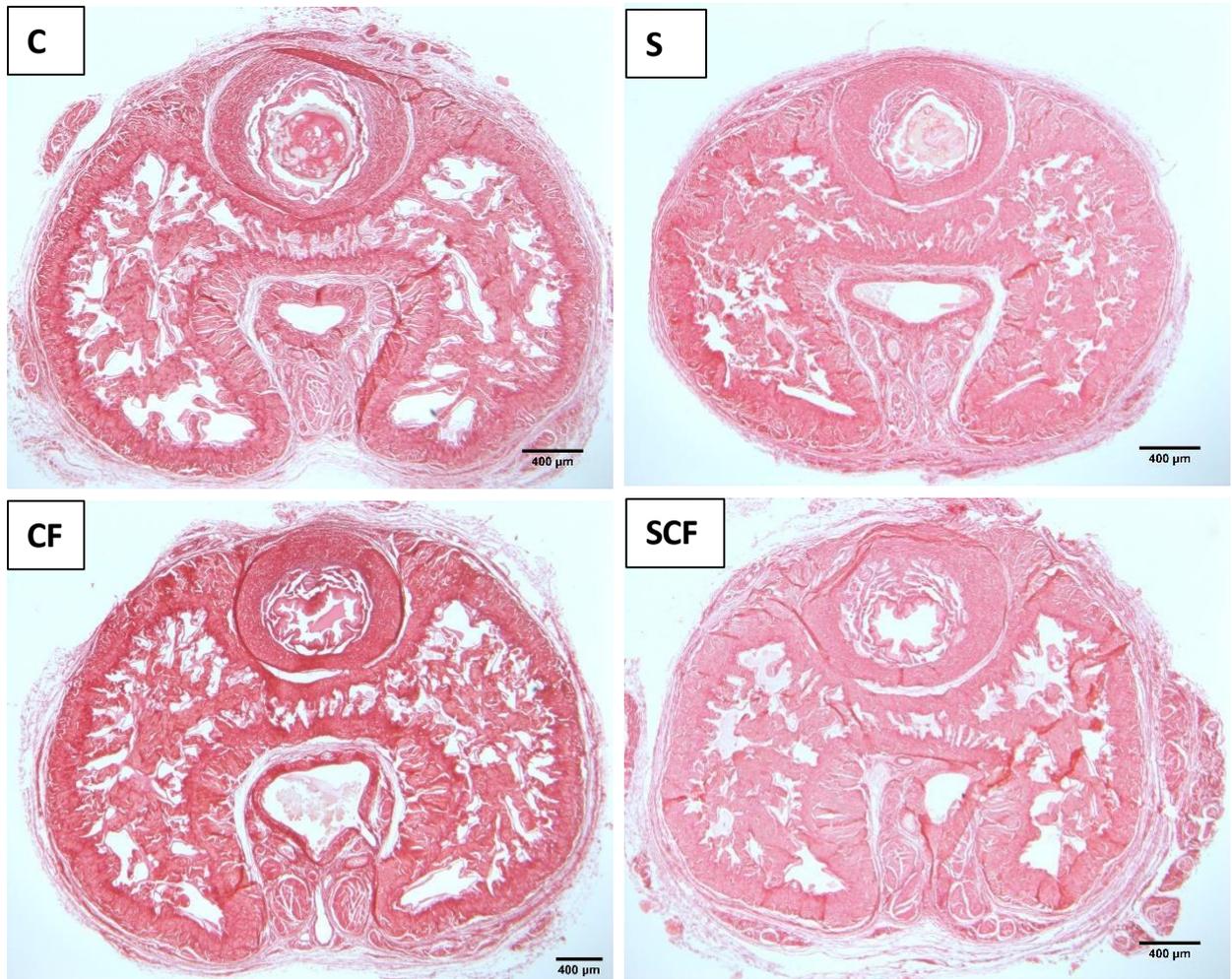
Gráfico 9 - Comparação entre as médias da área da TA do CC



**Legenda:** C: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*. TA: túnica albugínea. CC: corpo cavernoso. Não houve diferença estatística. Valor de  $p= 0,2725$ .

**Fonte:** O autor, 2023.

Figura 19 – Imagens histológicas que ilustram as alterações das áreas do pênis de ratos Wistars adultos



**Legenda:** C: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*.

As imagens histológicas demonstram os resultados observados nas mensurações das áreas total do pênis e nas áreas do corpos cavernosos. O grupo S apresentou redução na área total do pênis e redução na área do corpo cavernoso em relação grupo CF. As imagens foram realizadas com estereoscópio com objetiva de 1.5x e magnificação de 2.5x. Foi utilizado a técnica histológica de picosirius red.

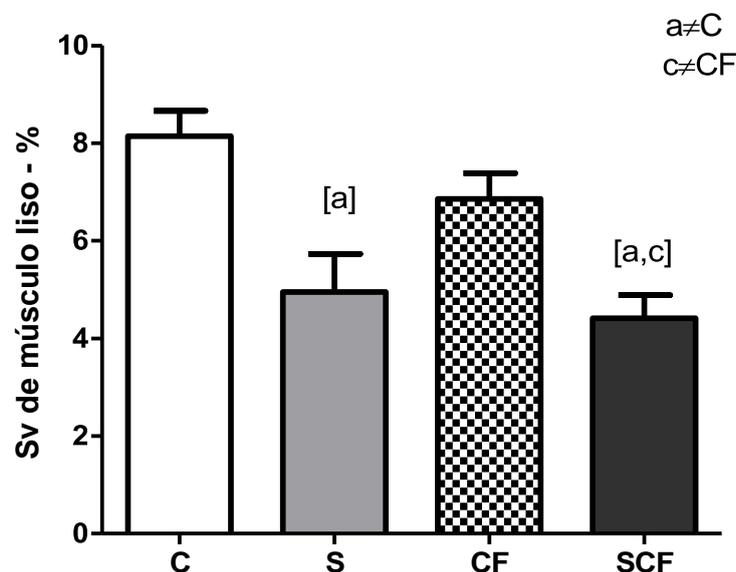
**Fonte:** O autor, 2023.

### 3.3.2 Densidades de superfície (Sv) do corpo cavernoso

Quanto as Sv dos tecidos avaliados do corpo cavernoso, sendo estes: Sv de tecido músculo liso e a Sv de tecido conjuntivo, foram identificadas alterações em suas proporções nos distintos grupos analisados.

Em relação a Sv de músculo liso no corpo cavernoso a morfometria aponta para uma redução deste tecido nos grupos estressados em relação aos grupos controles, como pode ser visto no gráfico 10. Ao comparar o grupo C com o grupo S e o grupo C com SCF é notado uma redução de músculo liso de 39,19% e 45,75%, respectivamente. Já na comparação entre o grupo CF com o grupo SCF houve uma redução de 35,63% de tecido conjuntivo no grupo SCF. Nas demais comparações não foi encontrado diferença estatística. As comparações foram significativas apresentando valor de  $p=0,0004$ .

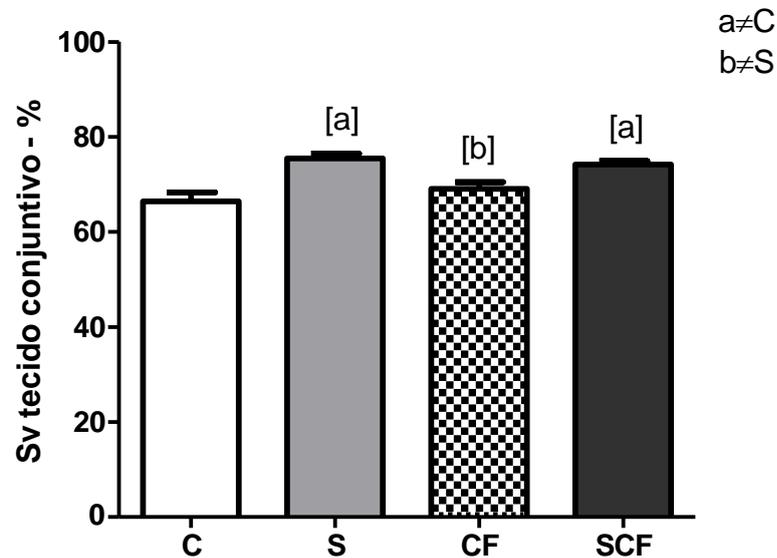
Gráfico 10 – Sv de músculo liso no CC de ratos Wistars estressados e controles com e sem a oferta de dieta do tipo *comfort food*



**Legenda:** S: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: Grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*. Sv: densidade de superfície. CC: corpo cavernoso. a: diferente de C; c: diferente de CF. Valor de  $p=0,0004$ .

**Fonte:** O autor, 2023.

Gráfico 11 – Sv de tecido conjuntivo no CC de ratos Wistars estressados e controles com e sem oferta de dieta do tipo *comfort food*



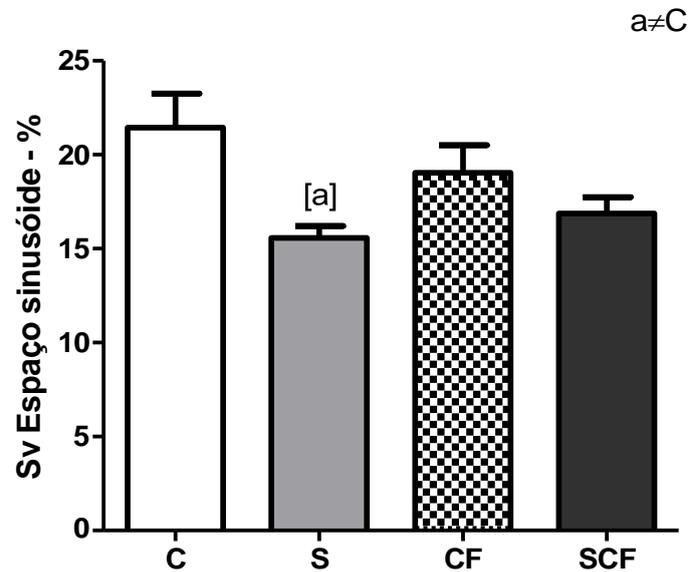
**Legenda:** C: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*. Sv: densidade de superfície. CC: corpo cavernoso. a: diferente de C; b: diferente de S. Valor de  $p=0,0001$ .

**Fonte:** O autor, 2023.

Quanto a Sv de espaço sinusóide foi identificado uma redução de 27,33% na comparação do grupo S com o grupo C, com valor de  $p=0,0197$ . As demais comparações entre os grupos não apresentaram diferença estatística (gráfico 12).

As comparações estatísticas realizadas neste tópico estão ilustradas nas fotomicrografias apresentadas na figura 20.

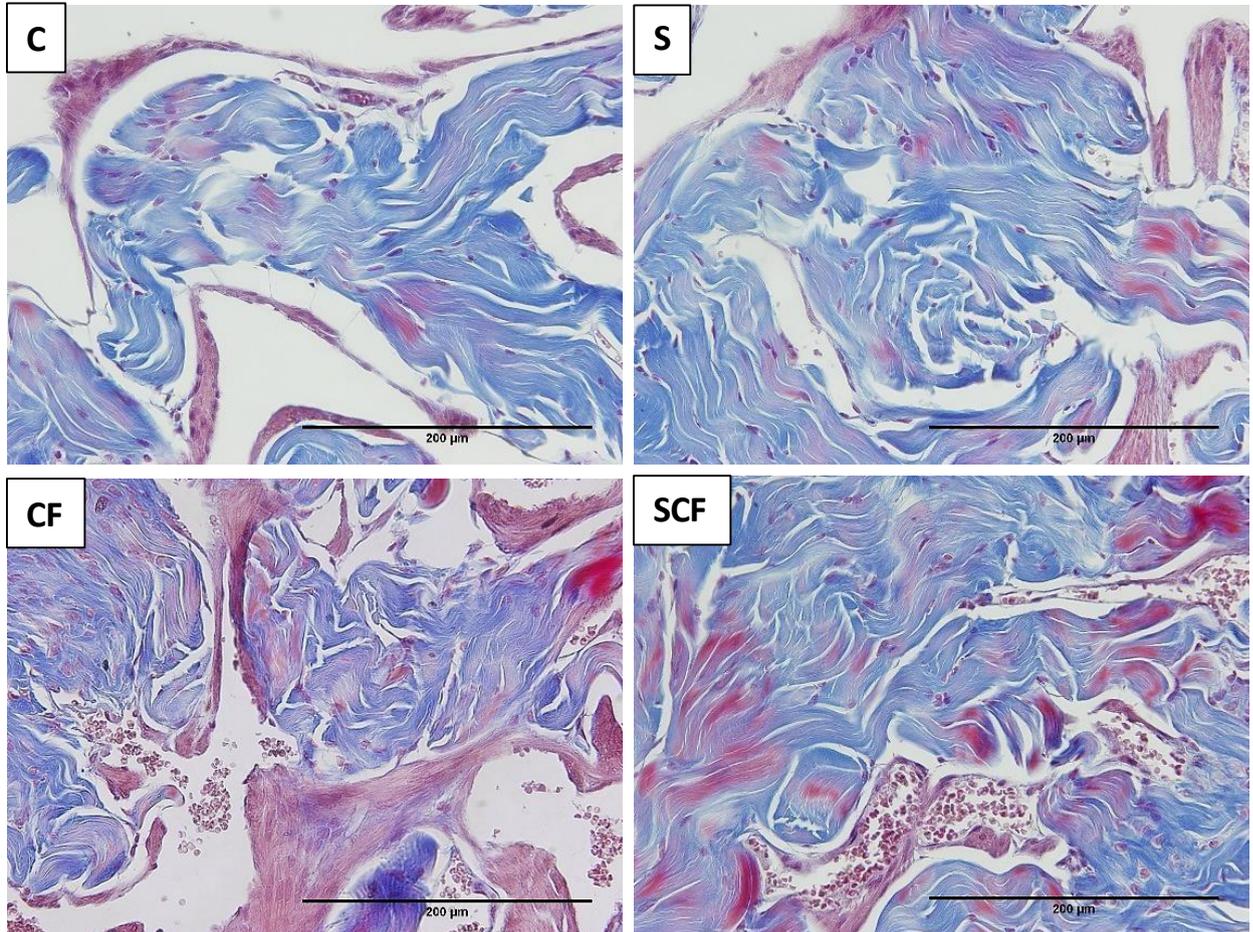
Gráfico 12 – Sv de espaço sinusóide no CC de ratos Wistars estressados e controles com e sem oferta de dieta do tipo *comfort food*



**Legenda:** C: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*. Sv: densidade de superfície. CC: corpo cavernoso. a: diferente de C. Valor de  $p=0,0197$ .

**Fonte:** O autor, 2023.

Figura 20 – Fotomicrografias do corpo cavernoso do pênis de ratos Wistar adultos que ilustram as alterações morfométricas



**Legenda:** C: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: grupo controle com dieta padrão + *comfort food*; SCF: grupo estresse com dieta padrão + *comfort food*.

As fotomicrografias demonstram os resultados observados nas mensurações das Sv do tecido conjuntivo, músculo liso e espaço sinóide do corpo cavernoso do pênis de ratos Wistars adultos. As imagens estão no aumento de 400 vezes. Foi utilizado a técnica histológica de tricrômico de Massom.

**Fonte:** O autor, 2023.

Os resultados apresentados anteriormente estão compilados na tabela 2 apresentada a seguir.

Tabela 2 – Dados biométricos e valores das análises morfométricas de ratos Wistar estressados e controles com e sem oferta de dieta do tipo *comfort food*

Parâmetros	C	S	CF		SCF		p Valor
<b>Glicemia - inicial (mg/dL)</b>	89,25 ± 9,19	98,63 ± 13,21	95,38 ± 14,69		89,29 ± 11,88		0,3701
<b>Glicemia - final (mg/dL)</b>	89,19 ± 7,96	96,13 ± 13,67	102,90 ± 15,30		87,88 ± 11,22		0,0786
<b>Massa corporal - final (g)</b>	388,10 ± 70,45	378,60 ± 43,53	423,70 ± 38,93		364,90 ± 31,75		0,8481
<b>Ingestão da dieta (g)</b>	27,77 ± 1,69	27,81 ± 1,95	26,51 ± 2,04		23,81 ± 1,67 <sup>[a,b,c]</sup>		<b>0,0004</b>
<b>Ingestão da dieta (kcal/kg MC)</b>	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,03 <sup>[a]</sup>		0,25 ± 0,03 <sup>[c]</sup>		<b>0,0098</b>
<b>Preferência alimentar (g)</b>	-	-	<b>Padrão</b>	<b>FL</b>	<b>Padrão</b>	<b>FL</b>	<b>&lt;0,0001</b>
			9,70 ± 0,95	16,81 ± 1,52 <sup>[*]</sup>	7,36 ± 1,70 <sup>[*,#]</sup>	16,45 ± 1,89 <sup>[*,§]</sup>	
<b>Área total do pênis (mm<sup>2</sup>)</b>	7,53 ± 1,26	7,04 ± 0,62	7,60 ± 0,75 <sup>[b]</sup>		7,29 ± 0,79		<b>0,0183</b>
<b>Área do CC com TA (mm<sup>2</sup>)</b>	5,22 ± 0,82	4,81 ± 0,39	5,17 ± 0,59 <sup>[b]</sup>		4,93 ± 0,48		<b>0,0084</b>
<b>Área do CC sem TA (mm<sup>2</sup>)</b>	2,97 ± 0,65	2,70 ± 0,55	2,78 ± 0,42 <sup>[b]</sup>		2,51 ± 0,34		<b>0,0064</b>
<b>Túnica Albugínea (mm<sup>2</sup>)</b>	2,36 ± 0,27	2,17 ± 0,51	2,37 ± 0,33		2,42 ± 0,39		0,2725
<b>Sv Músculo liso (%)</b>	8,14 ± 1,48	4,95 ± 2,20 <sup>[a]</sup>	6,86 ± 1,48		4,42 ± 1,24 <sup>[b,c]</sup>		<b>0,0004</b>
<b>Sv de tecido Conjuntivo (%)</b>	66,43 ± 5,40	75,47 ± 2,86 <sup>[a]</sup>	69,09 ± 3,70 <sup>[b]</sup>		74,18 ± 1,92 <sup>[a]</sup>		<b>0,0001</b>
<b>Espaço sinusóide (%)</b>	21,44 ± 5,16	15,58 ± 1,78 <sup>[a]</sup>	19,04 ± 4,17		16,87 ± 2,31		<b>0,0197</b>

**Legenda:** C: grupo controle com dieta padrão; S: grupo estresse com dieta padrão; CF: grupo controle com dieta padrão mais *comfort food*; CF: grupo estresse com dieta padrão mais *comfort food*. MC: massa corporal; CC: corpo cavernoso; TA: túnica albugínea; a: diferente de C; b: diferente de S; c: diferente de CF. \*: diferente de CF (padrão); #: diferente de CF (FL); §: diferente de SCF (padrão). Dados expressos por média e desvio padrão. Para dados paramétricos, foi realizado o teste estatístico de one-way (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. Para dados não paramétricos, foi realizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Duns. Os dados foram considerados significativos quanto p<0,05.

#### 4. DISCUSSÃO

O presente estudo busca entender o efeito do estresse crônico sobre o comportamento alimentar do indivíduo e as possíveis alterações biométrica e morfométricas em indivíduos saudáveis. Para isso foi utilizado o modelo animal, ratos Wistars, com o intuito de simular esse cenário desejado ao estudo, tendo em vista as semelhanças encontradas biologicamente entre os humanos e os indivíduos escolhidos para a pesquisa.

No que tange os parâmetros biométricos analisados, não foi percebido, estatisticamente, alterações entre os grupos adotados para este estudo. Tanto o peso corporal dos ratos, assim como o valor da glicemia capilar não apresentaram alterações. Os dois alimentos ofertados aos animais, possuem composições distintas, entretanto o alimento do tipo *comfort food* não é um modelo validado de dieta para indução de alterações metabólicas nos indivíduos, apesar de ser rico em açúcares e pobre em fibras e nutrientes. É um alimento que foi adotado como proposta de estratégia de fuga ao estresse induzido, justamente para avaliar sua eficácia nesse mecanismo de recompensa utilizado como fuga do estresse percebido pelo indivíduo (DALLMAN, et al., 2003). A indução do estresse crônico em animais deste estudo demonstrou um aumento pela ingestão do alimento do tipo *comfort food* tanto os submetidos a estresse (SCF, 57,33%) quanto aos não submetidos (CF, 43,23%). Entretanto, os animais submetidos a estresse crônico e ofertado as duas dietas apresentaram um aumento no consumo na ordem de 18,54% a mais do que o grupo não submetido a estresse crônico e sendo também ofertado ambas as dietas. Esse fator sugere uma preferência alimentar nesses indivíduos submetidos a estresse crônico por alimentos reconfortantes. Quanto a isto, Ortolani e colaboradores (2014) corroboram os resultados encontrados ao sugerir que há uma preferência alimentar nesses indivíduos estressados por alimentos reconfortantes. Além disso, foi visto que essa relação pode levar a um perfil ansiogênico nos indivíduos e anorexigênico, mesmo se alimentando com alimentos em suma mais calóricos, como é de característica dos alimentos *comfort food* (ORTOLANI et al., 2014).

As análises teciduais realizadas neste presente estudo também apontam para efeitos deletérios do estresse crônico nos animais. A área total do pênis do grupo S, por exemplo, apresenta uma redução de 6,7% em relação ao grupo CF. Assim como a área do corpo cavernoso sem túnica albugínea no grupo S demonstrou redução de 7,03% em relação ao grupo CF. Fato semelhante ocorrido no estudo de Ribeiro e colaboradores (2019) que também encontraram uma redução na área do corpo cavernoso sem túnica albugínea (16%) no grupo estresse crônico adulto em relação ao seu controle. Esses resultados citados sugerem um efeito danoso na

composição tecidual do pênis dos ratos submetidos ao estresse crônico, onde a perda de tecidos eréteis por tecidos pouco especializados podem diminuir a capacidade funcional do tecido erétil do corpo cavernoso, tendo em vista que essa mudança de composição tecidual supracitada pode sugerir fibrose peniana (de SOUZA et al., 2012).

Essa alteração de composição tecidual no corpo cavernoso do pênis dos animais analisados pode ser vista pelos resultados obtidos neste estudo. A análise de Sv de tecido conjuntivo aponta para um aumento desse tecido nas comparações com os grupos estressados em relação aos seus controles. O grupo S apresentou aumento do tecido conjuntivo em 12,79% em relação ao C. Assim como o grupo SCF aumentou em 10,42% o tecido conjuntivo em comparação ao grupo C e o S aumentou em 9,23% em relação ao CF. Ou seja, a presença do estresse crônico foi capaz de aumentar a composição de tecido conjuntivo nos corpos cavernosos. Outros estudos com metodologia de indução de estresse crônico também por contenção, apresentaram resultados similares aos resultados encontrados em nosso estudo, nos quais indicam um aumento acentuado na proporção de tecido conjuntivo no corpo cavernoso de animais estressados em relação aos seus controles (RIBEIRO et al., 2019; de SOUZA et al., 2012).

O estresse foi capaz também de gerar uma redução significativa de músculo liso no grupo S de 39,18% em relação ao C. Na comparação do grupo SCF com os grupos C e CF também foi visto uma redução de 47,54% e 37,93% respectivamente. Assim como os espaços sinusóides, que por possível consequência da diminuição das estruturas eréteis no corpo cavernoso, apresentou uma redução de 27,33% no grupo S em relação ao C.

O estudo dos autores de Souza e colaboradores (2012), ao avaliar o efeito do estresse crônico com similar modelo de indução por contenção, encontrou uma redução de 36% na densidade de músculo liso e um aumento de 20% da densidade de tecido conjuntivo no corpo cavernoso de ratos Wistars, o que apresenta-se de forma similar aos achados de nosso estudo. Os níveis séricos de testosterona diminuíram em 57% e houve um aumento na massa da glândula adrenal em 15% descrito por de Souza e colaboradores (2012), reforçando que o estresse crônico hiperativa a glândula adrenal e afeta diretamente a síntese de testosterona.

Apesar de no atual estudo não ter sido mensurado os níveis séricos de testosterona, as análises morfométricas realizadas evidenciaram alteração na composição do tecido erétil do corpo cavernoso ainda mais deletérias do que descritas por de Souza e colaboradores (2012). Haja vista que, o protocolo de indução de estresse seguiu os mesmos métodos sendo prolongado por mais duas semanas, pode-se relacionar que a redução nos níveis séricos de testosterona

poderia estar também presente e que sua ação prolongada prejudicou ainda mais a morfologia do corpo cavernoso.

O estudo de Ribeiro e colaboradores (2018), demonstrou que os ratos adultos submetidos à estresse crônico e avaliados de forma imediata reduziram em 42% a densidade de músculo liso em relação ao seu grupo controle. Já a avaliação tardia após a retirada do estresse demonstrou um aumento na densidade de músculo liso em 77% do que a avaliação imediata a terapia do estresse. A similaridade na redução no músculo liso é vista novamente, o que corrobora com nosso presente estudo. A piora durante a terapia do estresse e a melhora após a retirada do estresse pode estar relacionado a hipótese de que a hiperativação do eixo HPA durante o estresse eleva os fatores inflamatórios no corpo cavernoso e que estes afetam diretamente o tecido erétil. E que ao retirar o estresse a compensação do eixo HPA normaliza os fatores inflamatórios diminuindo o estresse oxidativo no tecido erétil, preservando o músculo liso.

Como descrito nos parágrafos anteriores, o estresse foi capaz de gerar alterações na histologia do corpo cavernoso ao que se refere as proporções das densidades de tecido erétil e não erétil como identificado neste estudo. O aumento de depósitos de fibras colágenas na matriz extracelular, características encontradas na fibrose peniana, são vistos também em doenças que tem como consequência a disfunção erétil, como por exemplo, a doença de peyrone e na disfunção veno-oclusiva corporal (GONÇALVES-CADAVID, 2009).

Esta alteração descrita na arquitetura da histologia peniana diminui a capacidade de intumescência do pênis. Isso se dá pela perda de músculo liso, estrutura diretamente relacionada assim como dificulta a manutenção da ereção, pela fibrose encontradas também nas artérias penianas. A quebra da homeostase aumenta os fatores inflamatórios reduzindo a síntese de óxido nítrico o que prejudica ainda mais o relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso, que somado a diminuição do fluxo sanguíneo favorece a disfunção veno-oclusiva erétil (SAHIN et al., 2017). Este ciclo se retroalimenta e trabalha em favor do agravamento à disfunção.

Sahin e colaboradores (2018) em seu estudo evidenciaram que o estresse oxidativo desencadeado pela indução do estresse crônico por contenção aumentou fatores inflamatórios e esses quando atenuados por protetores são eficazes na manutenção da síntese de óxido nítrico no corpo cavernoso.

O estudo de Ortolani e colaboradores (2014) apesar de não demonstrar uma preferência alimentar por *comfort food* apontou que a oferta do alimento reconfortável foi capaz de atenuar os níveis da corticosterona sérica. Nessa mesma linha, Dallman e colaboradores (2003), sugerem que há uma relação na regulação do estresse crônico por meio da ingestão de alimentos

reconfortantes. Os efeitos da elevação dos glicocorticoides atuam em regular o que denominam de “a rede de resposta ao estresse crônico” e assim moderar estratégias e compulsões afim de vencer o estresse. Esse tipo de comportamento de reforço compensatório a alimentos de alto teor calórico pode alterar a resposta do cérebro aos alimentos, perpetuando hábitos alimentares que podem levar a consequências como obesidade e distúrbios metabólicos (TRYSON et al., 2013).

Apesar de no presente estudo os animais estressados preferirem se alimentar pelos alimentos do tipo *comfort food* isso não gerou ganho de peso significativo. Mas, o que podemos relacionar é que algumas análises morfométricas até o presente momento podem sugerir um prejuízo atenuado. Por exemplo, quanto a área total do pênis o grupo SCF não apresentou redução ao seu controle enquanto que o grupo S sim. Assim como a redução de músculo liso no corpo cavernoso parece ter sido atenuada no grupo SCF ao comparar com o grupo CF. E o aumento de tecido conjuntivo apresenta-se maior no grupo S (12,79%) do que no grupo SCF (10,42%) ao compararmos com o C. Os efeitos deletérios do estresse crônico tem sido relacionado em outros estudos, seja na evidência de piora em níveis de fatores inflamatórios (SAHIN et al., 2017), ou por prejuízo na síntese do óxido nítrico endotelial constitutivo do corpo cavernoso de pênis de ratos (SAHIN et al., 2018).

Este trabalho apresenta limitações por se tratar de um modelo animal, não sendo possível transpor os efeitos da indução de estresse crônico por imobilização diretamente para os humanos. O método de indução de estresse também é uma limitação na medida que, condiciona o animal ao mesmo período do dia, sobre o mesmo tipo de estresse, durante a mesma quantidade de horas. Diferente dos humanos que convivem com diferentes tipos de estímulos estressantes, em diferentes períodos do dia por tempo variado.

## CONCLUSÃO

Os animais estressados e que tinham a disposição as duas dietas foram os que apresentaram maior consumo calórico. A preferência alimentar pelo *comfort food* foi maior nos animais estressados. Houve redução na área do corpo cavernoso apenas no grupo estresse com dieta padrão. Os grupos estressados apresentaram diminuição no músculo liso e espaço sinusóide do corpo cavernoso, além de aumento no tecido conjuntivo.

Concluimos assim que os animais apresentaram preferência alimentar pela dieta do tipo *comfort food* e os animais estressados apresentam maior consumo da dieta *comfort food*, porém, não apresentaram alterações nos parâmetros biométricos. O estresse crônico foi capaz de diminuir a área do pênis e modificar a composição tecidual do corpo cavernoso com substituição de tecido erétil por tecido não funcional. Nas avaliações morfométricas o alimento de conforto sugere uma redução nos efeitos deletérios do estresse crônico.

## REFERÊNCIAS

- BENCHIMOL DE SOUZA, D. et al. Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: a morphometrical and stereological analysis. **Kidney Blood Press Res**, v. 34, n. 6, p. 424-9, Jun. 2011.
- CAMPOS-SILVA, P.; FURRIEL, A.; COSTA, W. S.; SAMPAIO, F. J.; GREGORIO, B. M. Metabolic and testicular effects of the long-term administration of different high-fat diets in adult rats. **International braz j urol**: official journal of the Brazilian Society of Urology. v. 41, n. 3, p. 569-75, Jun. 2015.
- CHAGAS, M. I. O. Stress in rehabilitation: the General Adaptation Syndrome and the adaptation of the individual to the reality of the disability. **Acta Fisiatr**, v. 17, n. 4, p. 193-9, Oct. 2010.
- DALLMAN, M. F.; PECORARO, N.; AKANA, S. F. et al. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 100, n. 20, p. 11696-701, Sep. 2003.
- DE SOUZA, A. C. et al. Effect of a high-fat diet on the rat bladder wall and bioactive action of Brazil nut oil. **International braz j urol**: official journal of the Brazilian Society of Urology. v. 45, n. 1, p. 161-168, Jan-Feb. 2018.
- DE SOUZA, D. B. *et al.* Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. **J Androl**, v. 33, n. 4, p. 735-9, Jul-Aug. 2012.
- DRAKE, R. L.; VOGL, W.; MITCHELL, A. W. M. Gray's Anatomia Clínica para Estudantes. 1 ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005.
- FELIX-PATRÍCIO, B. et al. Penile Histomorphometrical Evaluation in Hypertensive Rats Treated with Sildenafil or Enalapril Alone or in Combination: A Comparison with Normotensive and Untreated Hypertensive Rats. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 12, n. 1, p. 39-47, Jan. 2015.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. e ABRAHAMSOHN, P. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- MARCHON, R. G. et al. Immediate and Late Effects of Stress on Kidneys of Prepubertal and Adult Rats. **Kidney & blood pressure research**. v. 43, n. 6, p. 1919-26, Dez. 2018.
- MEDEIROS JÚNIOR, J. L. et al. Lard and/or canola oil-rich diets induce penile morphological alterations in a rat model. **Acta Cir Bras**. v. 29, supl. 1, p. 39-44, Mar. 2014.
- MELDRUM, D.R. et al. Erectile hydraulics: maximizing inflow while minimizing outflow. **J Sex Med**. v. 11, n. 5, p. 1208-20, May 2014.
- NETTER, Frank H. Atlas de anatomia humana. 7<sup>a</sup> ed. RIO DE JANEIRO: **Elsevier**, p. 602 2019.

OLIVEIRA, C. et al. Hypercaloric diet modulates effects of chronic stress: a behavioral and biometric study on rats. **Stress**. v. 18, n. 4, p. 514-23, Sep. 2015.

ORTOLANI, D. et al. Stress-induced endocrine response and anxiety: the effects of comfort food in rats. **Stress**. v. 17, n. 3, p. 211-8, May 2014.

PAPP, M.; WILLNER, P.; MUSCAT, R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. **Psychopharmacology**. v. 104, n. 2, p. 255-9, Jun. 1991.

PECORARO, N. et al. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. **Endocrinology**. v. 145, n. 82, p. 3754-62, Aug. 2004.

RETANA-MARQUEZ, S. et al. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, n. 2, p. 207-27, Feb. 2003.

RIBEIRO, C. T. et al. Immediate and late effects of chronic stress in the testes of prepubertal and adult rats. **Asian J Androl**, v. 20, n. 4, p. 385-90, Jan. 2018.

RIBEIRO, C. T. et al. Evaluation of the effects of chronic stress applied from the prepubertal to the adult stages or only during adulthood on penile morphology in rats. **Stress**, publicação online, p. 1-8, Jan. 2019.

ROM, O. e REZNICK, A. Z. The Stress Reaction: A Historical Perspective. **Adv Exp Med Biol**, v. 905, p. 1-4, Feb. 2016.

SABER, E. A. et al. Physiological and structural changes of the lung tissue in male albino rat exposed to immobilization stress. **J Cell Physiol**, publicação online, Oct. 2018.

SAHIN, T. D. et al. Penile constitutive nitric oxide synthase expression in rats exposed to unpredictable chronic mild stress: role of inflammation. **Int J Impot Res**. v. 29, n. 2, p. 76-81. Mar. 2017.

SAHIN T. D. et al. Depression induced by chronic stress leads to penile cavernosal dysfunction: protective effect of anti-TNF- $\alpha$  treatment. **Can J Physiol Pharmacol**. v. 96, n. 9, p. 933-42. Jul. 2018.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. **Biomed Pharmacother**, v. 87, p. 223-29, Jan. 2017.

SELYE, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **J Allergy**, v. 17, n. 6, p. 231;289;358, Nov. 1946.

SCHÖNER, J. et. al. Post-traumatic stress disorder and beyond: an overview of rodent stress models. **J. Cell. Mol. Med**, v. 21, n. 10, p. 2248-56, Oct. 2017.

SCOTT, K. A.; MELHORN, S. J.; SAKAI, R. R. Effects of Chronic Social Stress on Obesity. **Current obesity reports**. v. 1, n. 1, p. 16-25, Mar. 2012.

SZABO, S.; TACHE, Y.; SOMOGYI, A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor of nature. **Stress**, v. 15, n. 5, p. 472-8, Sep. 2012.

TANNENBAUM, et al. High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. **The American journal of physiology**. v. 273, n. 6, p. 1168-77, Dec. 1997.

TOMIYAMA, A. J.; DALLMAN, M. F.; EPEL, E. S. Comfort food is comforting to those most stressed: evidence of the chronic stress response network in high stress women. **Psychoneuroendocrinology**. v. 36, n. 10, p. 1513-9, Sep. 2011.

TRYON, M. S.; DeCANT, R., LAUGERO, K. D. Having your cake and eating it too: a habit of comfort food may link chronic social stress exposure and acute stress-induced cortisol hyporesponsiveness. **Physiol Behav**. v. 10; n. 32, p. 114-115, Apr. 2013.

TRIPATHI, S. J. et al. Basolateral amygdalar inactivation blocks chronic stress-induced lamina-specific reduction in prefrontal cortex volume and associated anxiety-like behavior. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 88, p. 194-207, Jan. 2019.

ULRICH-LAI, Y. M. et al. Stress exposure, food intake and emotional state. **Stress**, v. 18, n. 4, p. 381-99, Aug. 2015.

VAN BODEGOM, M.; HOMBERG, J. R.; HENCKENS, M. Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. **Front Cell Neurosci**, v. 11, p. 87, May 2017.

ZHOU, Q. et al. Chronic Unpredictable Mild Stress Accelerates the Growth of Bladder Cancer in a Xenograft Mouse Model. **Psychol Res Behav Manag**. v. 23, n. 13, p. 1289-97, Dec. 2020.

ZEENI, N. et al. A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. **Stress**. v. 16, n. 2, p. 211-9, Mar. 2013.

**ANEXO A – Aprovação do estudo pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA)**



**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO  
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)**

**ibrag** Instituto  
de Biologia  
Roberto  
Alcantara  
Gomes

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito do estresse crônico na preferência alimentar e na morfologia do sistema urogenital de ratos wistar adultos**", registrada com o nº 004/2019, sob a responsabilidade de **Bianca Martins Gregório** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 26/03/2019.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/03/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	24
Peso/Idade	200 g / 10 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 26 de Março de 2019.

Prof. Dr. Alex C. Manhães  
Coordenador  
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa  
Vice-Coordenadora  
CEUA/IBRAG/UERJ

# APÊNDICE A – Artigo 1

Heliyon 9 (2023) e17013



## Effects of comfort food diet on the penile morphology of stressed rats

Roger G. Marchon<sup>a</sup>, Bianca M. Gregório<sup>a</sup>, Waldemar S. Costa<sup>a</sup>,  
Marco Aurélio Pereira-Sampaio<sup>a,b</sup>, Francisco J. Sampaio<sup>a</sup>, Diogo B. De Souza<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Urgerital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

<sup>b</sup> *Department of Morphology, Federal Fluminense University, Niterói, RJ, Brazil*

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Comfort food  
Penis  
Stress

### ABSTRACT

**Purpose:** To investigate the effects of chronic stress, associated or not with comfort food, on the morphology of the penis.

**Materials & methods:** Thirty-two adult Wistar rats were divided into four experimental groups: Control group (C), receiving standard rat chow, and under normal conditions; Stressed group (S), receiving standard chow, and submitted to stressful situations; Control + comfort food group (C + CF), receiving standard chow and comfort food, and under normal conditions; and Stressed + comfort food group (S + CF), receiving standard chow and comfort food, and submitted to stressful situations. At 10 weeks of age, food supply and stress were initiated. All groups had ad libitum access to standard chow and water, and groups receiving comfort food also had access to Froot Loops®. Chronic stress was induced by restriction, animals were contained daily in polypropylene tubes for 2 h, for eight weeks. After eight weeks all animals were killed; penises were removed for histomorphometric analysis.

**Results:** Body mass was similar among the groups. Food intake in S + CF group was lower than in other groups. Concerning food preference, groups C + CF and S + CF preferred comfort food over the standard chow, with this preference being higher in S + CF than in C + CF. The area of the corpora cavernosa without tunica albuginea was lower in group S + CF than in group C. Most interestingly, the surface density of connective tissue in the corpora cavernosa was higher in groups S and S + CF compared to group C. In contrast, smooth muscle surface density was markedly lower in S + CF compared to groups C and C + CF, while group S also had reduced smooth muscle in comparison to group C.

**Conclusion:** Chronic stress caused a morphological alteration on penile histomorphometry. Also, stress increased the preference for comfort foods which caused more deleterious effects in some parameters.

### 1. Introduction

Sexual health is characterized by a multifactorial process coordinated by the neuroendocrine and vascular systems [1]. Sexual dysfunction represents an important medical and physiological problem that adversely affects not only physical health but also

\* Corresponding author.

E-mail address: [diogobenchimol@gmail.com](mailto:diogobenchimol@gmail.com) (D.B. De Souza).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17013>

Received 17 November 2022; Received in revised form 29 May 2023; Accepted 4 June 2023

Available online 5 June 2023

2405-8440/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

emotional well-being, seriously compromising the individual's self-esteem, body image, interpersonal relationships, and physical health [2]. Several studies have shown the impact of different (lifestyle-associated) conditions on sexual function, such as obesity [3], sedentarism [4], smoking [2] and chronic stress [5].

Exposure to stressors has become quite common in developed and underdeveloped countries, increasing the risk of erectile dysfunction [6]. Although stress is strongly linked to sexual dysfunction, there are few studies directly correlating the effect of chronic stress on sexual function, quality of life and food preference [7,8]. What is known is that a stressor stimulus hyperactivates the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, increasing the circulation of glucocorticoids (GCs) in the bloodstream. The elevation of GCs increases the excitation of neuronal receptors for pleasurable activities, such as the ingestion of foods rich in simple carbohydrates, drugs, and physical activities [9].

Regarding food intake, studies in animal models point to a direct relationship between chronic stress and appetite suppression (hypophagia) [10], while in humans it can increase or decrease food consumption [11,12]. In fact, exposure of rats to chronic stress modifies not only food intake but also the dietary pattern, particularly with respect to the intake of highly palatable foods (comfort food), which are rich in simple carbohydrates and lipids [9,13].

Previous studies carried out by our group showed that both isolated macronutrients and chronic stress modified the structure of certain organs of the urogenital system. Campos-Silva and collaborators found that the rats ingesting hypercaloric diets, (either the mother or the offspring) had decreased prostate secretory activity and spermatogenesis [14–16]. On the other hand, rats submitted to chronic stress had harmful effects on the morphology of the penis [17,18], spermatogenic cells [19] and kidneys [20]. However, the effects of chronic stress on food preference and the impact of comfort foods on stressed rats' penile morphology have not yet been investigated.

Thus, the objective of the present study is to investigate the effects of chronic stress, associated or not with comfort food, on the morphology of the penis. Our hypothesis is that the stress stimuli can alter the eating pattern of Wistar rats and the access to comfort food could interfere with the effects on the structure of the penis caused by stress.

## 2. Methods

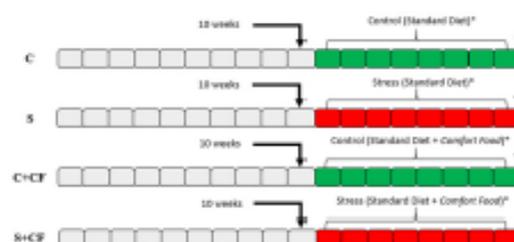
### 2.1. Animals

Thirty-two male Wistar rats were used in this study. All animals were bred in the Urogenital Research Unit animal facilities and were kept in a room with controlled temperature ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) and artificial dark-light cycles (lights on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.) and had free access to standard rat chow and water. This project was formally approved by the local ethics committee under protocol number CEUA-004/2019 and followed national and international regulations on animal experimental use.

### 2.2. Experimental design and interventions

When animals completed ten weeks of age they were included in the experiment. Four experimental groups, each one consisting of eight rats, were randomly assigned as follows: Control group (C); Stressed group (S); Control + comfort food group (C + CF); and Stressed + comfort food group (S + CF). Fig. 1 illustrates the experimental design.

Animals in groups C and S received only standard rat chow (Nuvilab CR-1, Quimtia, Colombo, Brazil) while groups C + CF and S + CF received Froot Loops (Kellogg Brazil, São Paulo, Brazil) in addition to the standard rat chow. Froot loops was used as comfort food due to its nutritional components which are listed in Table 1. The food intake was measured per cage (with 2 or 3 rats of the same group in each cage). For all groups the standard chow present in each cage was weighted daily and completed for 50 g per animal. For groups C + CF and S + CF, in addition to the standard chow, 30 g of Froot Loops per rat were offered, and its consumption was also weighted daily. Food consumption (in grams and Kilocalories per body mass) as well as food preference (in percentage of consumption in grams; for groups C + CF and S + CF) was calculated and compared among groups. Capillary blood glucose was measured (after a 12-h fast) at the beginning (10 weeks of age) and at the end of the experiment (18 weeks of age) with a portable glucose monitor (Accu-Chek,



**Fig. 1.** Illustrative image of the experimental design and group divisions. C: Control group; S: Stressed group; C + CF: Control + comfort food group; S + CF: Stressed + comfort food group. †: Euthanasia and tissue analysis. \*: Groups S and S + CF during the stress induction protocol were deprived of water and food. Groups C and C + CF were also deprived of water and food in the same period. All groups started the experiment when they reached ten weeks of age.

**Table 1**  
Experimental diet composition.

	Standard chow (Nuvilab CR-1)	Comfort food (Froot Loops)
Energy (Kcal/100g)	336	376
Carbohydrate (g/100g)	53.0	82.5
Protein (g/100g)	22.0	5.6
Total Fat (g/100g)	4.0	2.7
Dietary Fiber (g/100g)	7.0	3.0

Data provided by the manufacturers.

Roche, São Paulo, Brazil).

Animals in groups S and S + CF were submitted to a chronic stress protocol by the immobilization method [18,21]. Each animal was maintained in a rigid opaque plastic tube to restrain its movements, 2 h daily, during eight weeks. Tubes with different diameters and lengths were adjusted weekly depending on the animal's size. Meanwhile, the control groups (C and C + CF) were kept under normal conditions and not submitted to any stress procedure, but during the same period food was removed from stressed groups (2 h daily) to avoid any bias in food intake measurements. All animals were killed on the day after the last stress stimuli, when the animals were 18 weeks old.

### 2.3. Sample collection and analyses

After eight weeks of experiments, the animals were weighted and submitted to euthanasia by isoflurane (Isoflurano, BioChimico, Itatiaia, Brazil) inhalation in an induction chamber [22]. The penises were collected and their skin-denuded middle shafts were fixed in a 4% buffered formaldehyde solution. Samples were routinely processed for paraffin embedding and 5  $\mu$ m-thick sections were used for histomorphometric evaluations [18].

The cross-sectional penile area, the area of CC (including its tunica albuginea), and the area of CC without the tunica albuginea were evaluated in Sirius red stained sections. For this purpose, images were captured under 20 $\times$  magnification by a digital camera (Axiocam 506 color, Carl Zeiss, Jena, Germany) coupled to a stereomicroscope (Discovery V.8, Carl Zeiss). These areas were measured with the "Polygons" tool of the Image J software (version 1.45s, National Institutes of Health, Bethesda, USA), and expressed in mm<sup>2</sup>. The area of the tunica albuginea was calculated as the difference of CC area with and without its tunica albuginea [23,24].

The surface density (Sv) of corpus cavernosum connective tissue, sinusoidal space, and smooth muscle fibers was evaluated in Masson's trichrome stained sections. These sections were captured under 400 $\times$  magnification by a digital camera (DP70, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a microscope (BX51, Olympus). The Sv was calculated (for each structure) by the point counting method [25]. Briefly, a 100-point grid was superimposed over the images using the Image J software, and each structure "touched" by a point was counted. The result, expressed as a percentage, was calculated after measuring 25 images from different randomly captured fields for each animal [23,25].

### 2.4. Statistical analyses

All data was tested for normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons among all groups were performed by one-way ANOVA and Tukey's post-test. Food preference was analyzed by Student-t-test. Statistically significant differences were considered at  $p < 0.05$ . All results were presented as mean  $\pm$  standard deviation. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, San Diego, USA).

## 3. Results

### 3.1. Biometric and dietary analyses

Body mass and capillary blood glucose were similar among all groups at the beginning and at the end of the study. The food intake of S + CF was 14.2% lower than group C, 14.4% lower than group S, and 10.2% lower than group C + CF. Despite this lower food consumption, when energy intake was studied, it was found that group S + CF had similar values to groups C and S. Group C + CF (which was not submitted to stress but had access to comfort food) showed a higher energy intake in comparison to group C (12.5% higher) and group S + CF (8.0% higher).

For both groups that had access to comfort food (C + CF and S + CF), Froot Loops was preferred over standard chow. Animals in group C + CF consumed 81% more of the comfort food than standard chow, while in group S + CF, Froot Loops was consumed 142% more than standard chow. When comparing these results, a statistical difference of food preference was observed, with stressed animals consuming more comfort food than non-stressed animals.

### 3.2. Penile cross-sectional areas

Regarding the penile cross-sectional area, it was found that group C + CF had an 8.1% increase in comparison to group S. Also,

group C + CF had a 7.5% increase of the corpus cavernosum area (with tunica albuginea) in comparison to group S. Meanwhile, group S + CF showed a 15.5% reduction of the corpus cavernosum area (without tunica albuginea), in comparison to group C. No statistical difference was observed regarding the tunica albuginea area. Fig. 2 [A – G] illustrates these findings.

### 3.3. Cavernosal tissue analyses

The cavernosal smooth muscle surface density was reduced by 39.2% in group S in comparison to group C. A more drastic reduction was noted in group S + CF, with 45.7% and 35.5% lower values when compared to groups C and C + CF, respectively. The connective tissue surface density was augmented by 13.6% in group S in comparison to group C, and by 9.2%, in comparison to group C + CF. Group S + CF showed 11.6% higher values of this parameter in comparison to group C. The sinusoidal space surface density of group S showed a 27.3% reduction in comparison to group C. Fig. 3 [A – G] illustrates these findings. All numerical data are presented in Table 2. Table 3 presents the initial and final body mass of the animals.

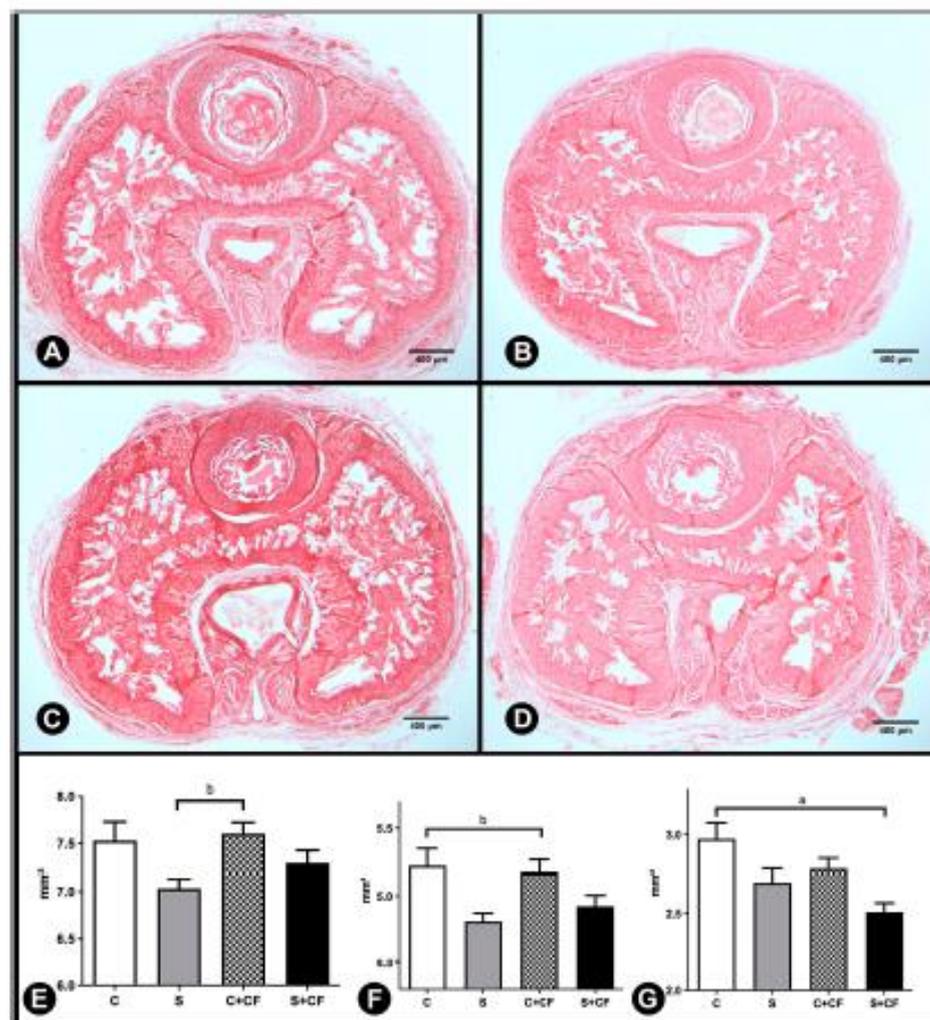


Fig. 2. Photomicrographs and graphics representing the penile cross-sectional areas. Cross sectional images of penis from Control group (A), Stressed group (B), Control + comfort food group (C), and Stressed + comfort food group (D). Sections were stained by Sirius red and captured under 20 × magnification. The graphics below presents the results of cross-sectional penile area (E), corpus cavernosum area with tunica albuginea (F), and corpus cavernosum area without tunica albuginea (G).

#### 4. Discussion

The results of the present study showed that highly palatable foods were preferentially consumed in both groups which had access to it. Nevertheless, the S + CF group had a higher preference for comfort foods than the C + CF group. This supports the hypothesis that stress stimuli can alter the eating pattern of rats, with stressed animals preferring comfort foods more than non-stressed animals. Some previous studies support these findings and suggest that stress conditions can lead to two profiles: the anxiogenic and the anorexigenic [9,26]. Although behavioral tests were not used in the present study, it was possible to observe that group S + CF had lower food consumption than group C + CF (both in grams and in kcal/kg of body mass). Thus, it is possible to state that in the current study stressed animals reduced food consumption while preferring comfort foods. It has been shown that exposure to highly palatable foods reduces anxiety-related behaviors in rodents, regardless of the stressor stimulus [27–29]. It is likely that the consumption of comfort foods may be an unconscious strategy used by animals to alleviate or ameliorate a provoked stress [30].

Regarding the histomorphometric parameters of the penis, group S + CF had a decrease in the area of the corpora cavernosa without tunica albuginea (when compared to C). A similar fact occurred in a study by Ribeiro et al. (2019) where a reduction of this parameter in the penis of stressed rats was found [17]. Interestingly, the control animals with access to comfort foods had augmented areas of the penis and of the corpora cavernosa with tunica albuginea. It is possible to suppose that in these animals the (non-statistically significant) rise in body mass could have led to these raised penile areas.

When the cavernosal tissue was analyzed, it was found that stress caused a marked reduction in smooth muscle content, with a more drastic reduction in stressed animals with access to comfort food. Meanwhile, connective tissue was augmented by stress. Penile

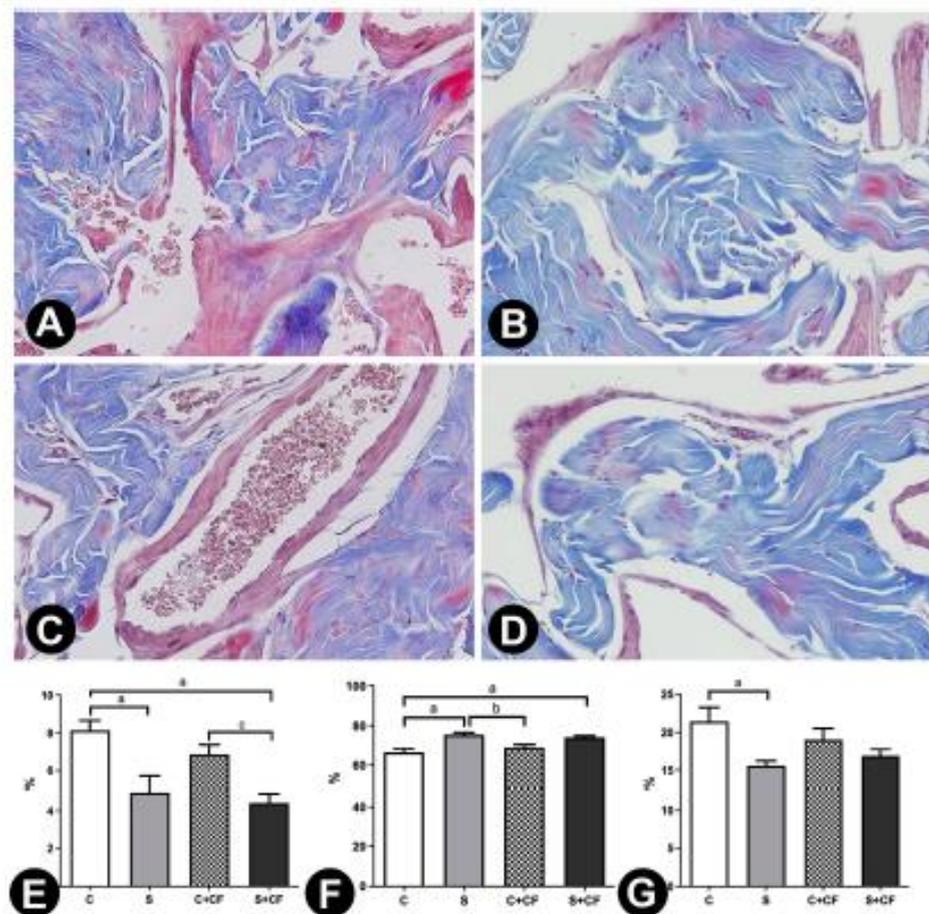


Fig. 3. Photomicrographs and graphics representing the Surface densities of corpus cavernosum structures. Images from the corpus cavernosum of Control group (A), Stressed group (B), Control + comfort food group (C), and Stressed + comfort food group (D). Sections were stained by Masson's trichrome and captured under 400 × magnification. The graphics below presents the results of smooth muscle surface density (E), connective tissue surface density (F), and sinusoidal space surface density (G).

**Table 2**  
Biometric data and penile morphometric analysis of experimental groups.

	C	S	C + CF	S + CF	p value
Blood glucose - initial (mg/dL)	89.25 ± 9.19	98.63 ± 13.21	95.38 ± 14.69	89.29 ± 11.88	0.3701
Blood glucose - final (mg/dL)	89.19 ± 7.95	96.13 ± 13.67	102.90 ± 15.30	87.88 ± 11.22	0.0786
Food intake (g)	27.77 ± 1.69	27.81 ± 1.95	26.51 ± 2.04	23.81 ± 1.67 <sup>(a)(c)</sup>	0.0004
Food intake (kcal/kg BM)	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.27 ± 0.03 <sup>(a)</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>(c)</sup>	0.0098
Food preference (%)	–	–	SC	CF	0.0110
			35.57 ± 2.82	64.43 ± 2.82	
			SC	CF	
			29.20 ± 5.30 <sup>(b)</sup>	70.80 ± 5.30 <sup>(b)</sup>	
Cross-sectional penile area (mm <sup>2</sup> )	7.53 ± 1.26	7.03 ± 0.62	7.60 ± 0.75 <sup>(a)</sup>	7.29 ± 0.79	0.0183
CC area with TA (mm <sup>2</sup> )	5.22 ± 0.82	4.81 ± 0.39	5.17 ± 0.50 <sup>(a)</sup>	4.93 ± 0.48	0.0084
CC area without TA (mm <sup>2</sup> )	2.97 ± 0.65	2.70 ± 0.55	2.78 ± 0.42	2.51 ± 0.34 <sup>(a)</sup>	0.0064
Tunica albuginea area (mm <sup>2</sup> )	2.36 ± 0.27	2.17 ± 0.51	2.36 ± 0.33	2.42 ± 0.39	0.2725
Sv [smooth muscle] (%)	8.14 ± 1.48	4.95 ± 2.20 <sup>(a)</sup>	6.86 ± 1.48	4.42 ± 1.24 <sup>(a)(c)</sup>	0.0004
Sv [connective tissue] (%)	66.43 ± 5.40	75.47 ± 2.86 <sup>(a)</sup>	69.09 ± 3.70 <sup>(a)</sup>	74.18 ± 1.92 <sup>(a)</sup>	0.0001
Sv [sinusoidal space] (%)	21.44 ± 5.16	15.58 ± 1.78 <sup>(a)</sup>	19.04 ± 4.16	16.87 ± 2.31	0.0197

C: Control group; S: Stressed group; C + CF: Control + comfort food group; S + CF: Stressed + comfort food group; CC: Corpus cavernosum; TA: Albuginea tunic; BM: Body mass; SC: Standard chow; CF: Comfort food. Data expressed as mean ± standard deviation. Data were considered different when  $p < 0.05$ . (a): Indicates statistical difference with group C; (b): indicates statistical difference with group S; (c): Indicates statistical difference with group C + CF.

**Table 3**  
Body mass of animals at the beginning and at the end of the study.

	Initial Body mass (g)	Final Body mass (g)
C	319.1 ± 57.85	388.1 ± 70.45
S	348.0 ± 29.63	378.6 ± 43.53
C + CF	373.0 ± 41.24	423.7 ± 38.93
S + CF	313.4 ± 24.90	364.9 ± 31.75

C: Control group; S: Stressed group; C + CF: Control + comfort food group; S + CF: Stressed + comfort food group. Initial (beginning of the experiment - 10 weeks) and final (end of the experiment - 18 weeks) body mass values. Data expressed as mean ± standard deviation.

erection occurs via smooth muscle relaxation, arterial dilation, and venous occlusion [31]. Therefore, any modification in one of these structures will trigger erectile dysfunction. Stress stimuli affects penile architecture, leading to greater deposition of connective tissue and lower concentration of smooth muscle in the sinusoidal space [18], in addition to decreasing endothelial nitric oxide synthesis in the corpus cavernosum of the penis [32]. Here, we realize that diets rich in simple carbohydrates (comfort food) follow the same line and can be considered a risk factor for the development of erectile dysfunction.

Chronic stress is associated with erectile dysfunction, and the loss of erectile tissue can decrease the functional capacity of the penis [18]. However, the deleterious effects of this condition on penile structures, especially the corpora cavernosa, are still poorly understood. Some conditions associated with erectile dysfunction, such as cardiovascular disease, smoking and alcohol, are positively related to a reduction in testosterone levels [28]. This hormone has a unique importance in erectile function and in the modulation of penile architecture [33], and its production may be compromised by the imbalance in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis generated by stress [34]. Previous studies have shown that testosterone levels are reduced as a result of chronic stress [19], thus, a hypothesis that should be further investigated is that the suppressed production of testosterone in stressed animals may trigger these structural changes found in the penis.

According to Cunha et al. (2020), comfort foods seem to decrease the concentration of serum corticosterone, and thus, attenuate the responses to the stressor stimulus. However, in the present study the association with the comfort food diet did not attenuate the effects on the structure of the penis caused by stress. On the contrary, in some parameters, stressed animals with access to comfort foods showed worse results than group S. The mechanism is not yet fully elucidated; however, it represents an imminent risk for triggering binge eating, and consequently obesity and associated metabolic disorders [26].

This work has limitations. As it was performed in animals, transposing the results to humans becomes a great challenge. Furthermore, the stress induction method was also considered a limitation, since the animals were immobilized at the same time of day, under the same stress conditions and at the same time, differently to what commonly occurs in stressed humans. Even so, these results help to understand some aspects of the biology of stress, its effects on penile structure, and its relation to food preference.

## 5. Conclusion

Chronic stress caused important structural damage to the penis which may be related to erectile dysfunction. Comfort foods are preferable for both groups with access to it, but stressed animals tended to consume even more of this type of diet. The consumption of comfort food aggravated penile damage caused by chronic stress and should be avoided during stressful situations.

### Author contribution statement

Roger G. Marchon: Conceived and designed the experiments; Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.

Bianca M. Gregório: Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.

Waldemar S. Costa; Marco A. Pereira-Sampaio: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.

Francisco J. Sampaio: Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Diogo B. De Souza: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

### Data availability statement

Data included in article/supp. material/referenced in article.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgements

This study was supported by grants from the Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), the Higher Education Personnel Improvement Coordination (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). These foundations were not involved in the study design, data collection, analysis, and interpretation, drafting of the manuscript and in the decision to submit for publication.

### References

- [1] E.A. Jannini, SM = SM: the interface of systems medicine and sexual medicine for facing non-communicable diseases in a gender-dependent manner, *Sex Med Rev* 5 (3) (2017 Jul) 349–364, <https://doi.org/10.1016/j.sexm.2017.04.002>.
- [2] D. Mellairolì, G. Ciocca, E. Limoncin, S. Di Sante, G.L. Gravina, E. Carosa, A. Lenzi, E.A.F. Jannini, Lifestyle and sexuality in men and women: the gender perspective in sexual medicine, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 18 (1) (2020 Feb 17) 10, <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0557-0>.
- [3] K.P. Impedatos, K. Stavropoulos, M. Doumas, K. Triantafyllidis, A. Karagiannis, V.G. Athyros, Sexual dysfunction, cardiovascular risk and effects of pharmacotherapy, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 16 (2) (2018 Jan 26) 130–142, <https://doi.org/10.2174/1570161115666170609101502>.
- [4] Y. Duca, A.E. Calogero, R. Casarella, F. Giaccone, L.M. Mongioli, R.A. Condorelli, S. La Vignera, Erectile dysfunction, physical activity and physical exercise: recommendations for clinical practice, *Andrologia* 51 (5) (2019 Jun), e13264, <https://doi.org/10.1111/and.13264>.
- [5] G. Hou, W. Xing, M. Wang, X. Chen, T.F. Yuan, Chronic stress influences sexual motivation and causes damage to testicular cells in male rats, *J. Sex. Med.* 11 (3) (2014 Mar) 653–663, <https://doi.org/10.1111/jsm.12416>.
- [6] G. Ciocca, E. Carosa, M. Stornelli, E. Limoncin, G.L. Gravina, R. Iannarelli, A. Sperandio, S. Di Sante, A. Lenzi, D. Lauro, E.A. Jannini, Post-traumatic stress disorder, coping strategies and type 2 diabetes: psychometric assessment after L'Aquila earthquake, *Acta Diabetol.* 52 (3) (2015 Jun) 513–521, <https://doi.org/10.1007/s00592-014-0686-8>.
- [7] J. Bancroft, J. Loftus, J.S. Long, Distress about sex: a national survey of women in heterosexual relationships, *Arch. Sex. Behav.* 32 (3) (2003 Jun) 193–208, <https://doi.org/10.1023/a:1023420431760>.
- [8] S.A. Kingsberg, G. Knudson, Female sexual disorders: assessment, diagnosis, and treatment, *CNS Spectr.* 16 (2) (2011 Feb) 49–62, <https://doi.org/10.1017/S109285291200017X>.
- [9] D. Ortolani, M.C. Garcia, L. Melo-Thomas, R.C. Spadari-Bratfisch, Stress-induced endocrine response and anxiety: the effects of comfort food in rats, *Stress* 17 (3) (2014 May) 211–218, <https://doi.org/10.3109/10253890.2014.896050>.
- [10] J. De Souza, A.A. Buefer, R.D. Caste, Disproportionate inhibition of feeding in A(y) mice by certain stressors: a cautionary note, *Neuroendocrinology* 72 (2) (2000 Aug) 126–132, <https://doi.org/10.1159/000054579>.
- [11] T.C. Adams, E.S. Epel, Stress, eating and the reward system, *Physiol. Behav.* 91 (4) (2007 Jul 24) 449–458, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.04.011>.
- [12] M.S. Ortiz, J. Sapanar, Longitudinal association between chronic psychological stress and metabolic syndrome, *Rev. Med. Chile* 146 (11) (2018 Nov) 1278–1285, <https://doi.org/10.4067/S0034-98872018001101278>.
- [13] N. Zenni, C. Daher, G. Frontentin, D. Tonne, N. Darcel, C. Chasmonat, A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats, *Stress* 16 (2) (2013 Mar) 211–219, <https://doi.org/10.3109/10253890.2012.708952>.
- [14] P. Campos-Silva, A. Fernandes, W. Costa, F.J. Sampaio, B. Gregorio, Fetal programming by high-fat diet promoted the decreased of the prostate in adult Wistar albino rats, *Mech. Dev.* 164 (2020 Dec), 103649, <https://doi.org/10.1016/j.mod.2020.103649>.
- [15] P. Campos-Silva, W.S. Costa, F.J.B. Sampaio, B.M. Gregorio, Prenatal and/or postnatal high-fat diet alters testicular parameters in adult Wistar Albino rats, *Histol. Histopathol.* 33 (4) (2018 Apr) 407–416, <https://doi.org/10.14670/HH-11-941>.
- [16] P. Campos-Silva, A. Furlati, W.S. Costa, F.J. Sampaio, B.M. Gregorio, Metabolic and testicular effects of the long-term administration of different high-fat diets in adult rats, *Int. Braz. J. Urol.* 41 (3) (2015 May-Jun) 569–575, <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.0244>.
- [17] C.T. Ribeiro, W.S. Costa, F.J.B. Sampaio, M.A. Pereira Sampaio, D.B. de Souza, Evaluation of the effects of chronic stress applied from the prepubertal to the adult stages or only during adulthood on penile morphology in rats, *Stress* 22 (2) (2019 Mar) 248–255, <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1553946>.
- [18] D.B. de Souza, D. Silva, C.M. Cortez, W.S. Costa, F.J. Sampaio, Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats, *J. Androl.* 33 (4) (2012 Jul-Aug) 735–739, <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014225>.
- [19] C.T. Ribeiro, D.B. De Souza, W.S. Costa, F.J.B. Sampaio, M.A. Pereira-Sampaio, Immediate and late effects of chronic stress in the testes of prepubertal and adult rats, *Asian J. Androl.* 20 (4) (2018 Jul-Aug) 585–590, <https://doi.org/10.4103/ajaj.6817>.
- [20] R.G. Marchon, C.T. Ribeiro, W.S. Costa, F.J.B. Sampaio, M.A. Pereira-Sampaio, D.B. de Souza, Immediate and late effects of stress on kidneys of prepubertal and adult rats, *Kidney Blood Press. Res.* 43 (5) (2018) 1919–1926, <https://doi.org/10.1159/000496004>.
- [21] D. Benchimol de Souza, D. Silva, C. Marinho Costa Silva, F.J. Barcellos Sampaio, W. Silva Costa, C. Martins Cortez, Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: a morphometrical and stereological analysis, *Kidney Blood Press. Res.* 34 (5) (2011) 424–429, <https://doi.org/10.1159/000328331>.

- [22] I.M. Prociópio, M.A. Pereira-Sampaio, W.S. Costa, F.J.B. Sampaio, D.B. Souza, Histomorphometric comparison of the corpus cavernosum of rats submitted to euthanasia with ketamine and xylazine or isoflurane, *Acta Cir. Bras.* 36 (11) (2021 Dec 8), e361103, <https://doi.org/10.1590/ACR361103>.
- [23] M.H.A. Da Silva, J.L. Medeiros Jr., W.S. Costa, F.J.B. Sampaio, D.B. De Souza, Effects of the dutasteride and sildenafil association in the penis of a benign prostatic hyperplasia animal model, *Aging Male* 23 (5) (2020 Dec) 1009–1015, <https://doi.org/10.1080/13685538.2019.1653839>.
- [24] B. Felix-Patricio, J.L. Medeiros Jr., D.B. De Souza, W.S. Costa, F.J. Sampaio, Penile histomorphometrical evaluation in hypertensive rats treated with sildenafil or enalapril alone or in combination: a comparison with normotensive and untreated hypertensive rats, *J. Sex. Med.* 12 (1) (2015 Jan) 39–47, <https://doi.org/10.1111/jsm.12750>.
- [25] B. Felix-Patricio, D.B. De Souza, B.M. Gregório, W.S. Costa, F.J. Sampaio, How to quantify penile corpus cavernosum structures with histomorphometry: comparison of two methods, *BioMed Res. Int.* 2015 (2015), 832156, <https://doi.org/10.1155/2015/832156>.
- [26] A. Cunha, R. Dalle Molle, D.P. Laureano, A.R. Reis, C. Corvêa, U.S. Matte, P.P. Silveira, T.D. Machado, Comfort-foods' chronic intake has different behavioral and neurobiological effects in male rats exposed or not to early-life stress, *J Dev Orig Health Dis* 11 (1) (2020 Feb) 18–24, <https://doi.org/10.1017/S2040174419000291>.
- [27] J. Maniam, M.J. Morris, Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment, *Psychoneuroendocrinology* 35 (5) (2010 Jun) 717–728, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.10.013>.
- [28] J. Maniam, C.P. Antoniadis, V. Le, M.J. Morris, A diet high in fat and sugar reverses anxiety-like behaviour induced by limited nesting in male rats: impacts on hippocampal markers, *Psychoneuroendocrinology* 68 (2016 Jun) 202–209, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.03.007>.
- [29] J.Y. Kim, J.H. Lee, D. Kim, S.M. Kim, J. Koo, J.W. Jahng, Beneficial effects of highly palatable food on the behavioral and neural adversities induced by early life stress experience in female rats, *Int. J. Biol. Sci.* 11 (10) (2015 Aug 1) 1150–1159, <https://doi.org/10.7150/ijbs.12044>.
- [30] M.F. Dallman, N. Pecoraro, S.F. Akana, S.E. La Fleur, F. Gomez, H. Houshyar, M.E. Bell, S. Bhatnagar, K.D. Languero, S. Manalo, Chronic stress and obesity: a new view of comfort food, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (20) (2003 Sep 30) 11696–11701, <https://doi.org/10.1073/pnas.1934666100>.
- [31] S.M. Macdonald, A.L. Burnett, Physiology of erection and pathophysiology of erectile dysfunction, *Urol. Clin.* 48 (4) (2021 Nov) 513–525, <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2021.06.009>.
- [32] Y. Yazici, T. Utkan, T.D. Şahin, S.S. Gomez, Improvement of penile neurogenic and endothelial relaxant responses by chronic administration of rezeratalol in rabbits exposed to unpredictable chronic mild stress, *Int. J. Impot. Res.* 30 (4) (2018 Aug) 163–170, <https://doi.org/10.1038/s41443-018-0016-8>.
- [33] A.M. Traish, I. Goldstein, N.N. Kim, Testosterone and erectile function: from basic research to a new clinical paradigm for managing men with androgen insufficiency and erectile dysfunction, *Eur. Urol.* 52 (1) (2007 Jul) 54–70, <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.02.034>.
- [34] M.G. Oyola, R.J. Hinda, Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress reactivity, *Stress* 20 (5) (2017 Sep) 476–494, <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1369523>.

## APÊNDICE B – Artigo 2



Stress

The International Journal on the Biology of Stress

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: [www.tandfonline.com/journals/ists20](http://www.tandfonline.com/journals/ists20)

## Effects of chronic stress on bladder morphology of rats and impact of comfort food diet as an ameliorating agent

Roger G. Marchon, Bianca M. Gregório, Marco A. Pereira-Sampaio, Waldemar S. Costa, Francisco J. Sampaio & Diogo B. De Souza

To cite this article: Roger G. Marchon, Bianca M. Gregório, Marco A. Pereira-Sampaio, Waldemar S. Costa, Francisco J. Sampaio & Diogo B. De Souza (2023) Effects of chronic stress on bladder morphology of rats and impact of comfort food diet as an ameliorating agent, *Stress*, 26:1, 2265160, DOI: [10.1080/10253890.2023.2265160](https://doi.org/10.1080/10253890.2023.2265160)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10253890.2023.2265160>



© 2023 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



[View supplementary material](#)



Published online: 07 Oct 2023.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 314



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

## Effects of chronic stress on bladder morphology of rats and impact of comfort food diet as an ameliorating agent

Roger G. Marchon<sup>a</sup> , Bianca M. Gregório<sup>a</sup> , Marco A. Pereira-Sampaio<sup>a,b</sup> , Waldemar S. Costa<sup>a</sup> , Francisco J. Sampaio<sup>a</sup>  and Diogo B. De Souza<sup>a</sup> 

<sup>a</sup>Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; <sup>b</sup>Department of Morphology, Federal Fluminense University, Niterói, RJ, Brazil

### ABSTRACT

**Objectives:** To investigate the effects of chronic stress on bladder morphology and the impact of food preference (standard or comfort foods) on the bladder of stressed rats.

**Methods:** In total, 32 Wistar male rats (3 months old) were divided into four groups: control (C), stressed (S), control+comfort food (C+CF), and stressed+comfort food (S+CF). Groups C and C+CF were maintained under normal conditions, while groups S and S+CF were subjected to chronic stress by the restraint method. Groups C and S received standard rat chow, while groups C+CF and S+CF received comfort food (Froot Loops®) and standard chow. The stress stimuli were induced daily for 2 h over 8 weeks. After 8 weeks, all animals were killed, and the bladders were removed and used for histomorphometric analysis.

**Results:** Body mass was similar among the groups. Stress did not promote differences regarding food intake, but animals receiving comfort food showed higher calories intake (in kcal/kg) than animals receiving only standard chow. The C+CF and S+CF groups preferred comfort food over the standard chow; this preference was higher in the S+CF than in the C+CF group. The surface density of smooth muscle was reduced in stressed animals, while connective tissue and elastic system fiber content were increased in stressed groups. Further, epithelial height was increased in rats submitted to chronic stress. The surface density of elastic system fibers was decreased by the consumption of comfort food.

**Conclusions:** Chronic stress induces morphological modifications on the bladder wall and epithelium. These modifications may be related to lower urinary tract symptoms. Additionally, chronic stress caused a higher preference for comfort food intake which did not ameliorate or aggravate the stress-induced bladder alterations.

### ARTICLE HISTORY

Received 24 April 2023

Accepted 23 September 2023

### KEYWORDS

Bladder; chronic stress; comfort food; epithelial height; morphometry; surface density

### Introduction

Chronic stress is associated with functional and morphological alterations in different organs and systems (Marchon et al., 2018; Ribeiro et al., 2018, 2019; Tynan et al., 2010). Among these organs, our research group has demonstrated that several urogenital organs exhibit deleterious morphological modifications promoted by chronic stress. The kidneys of stressed rats have fewer nephrons than those of non-stressed animals (Benchimol de Souza et al., 2011; Marchon et al., 2018). In the testicle, chronic stress induces modifications in seminiferous tubules, negatively impacting spermatozoid quality (Ribeiro et al., 2018). The penis is also affected by chronic stress, with fibrotic tissue substituting the normal cavernosal smooth muscle content necessary for penile erection (de Souza et al., 2012; Ribeiro et al., 2019).

Current evidence indicates that chronic stress results in urinary symptoms, such as urinary frequency, urgency, incontinence, and pelvic pain (Chang et al., 2009). Several mechanisms have been proposed for stress-associated lower urinary tract dysfunction, including neuronal (both central and peripheral), inflammatory, and local mechanisms (Chang et al., 2009; Mann et al., 2015). Among the local effects of chronic stress, the impact on bladder morphology has not been extensively investigated. As morphology and function are directly associated, studying the different components of the bladder in stressed individuals can provide morphological evidence of clinically observed functional changes. For this purpose, morphometric methods are quite suitable, as they provide objective and numerical information about the structural components of the bladder.

**CONTACT** Diogo B. De Souza  [diogobenchimol@gmail.com](mailto:diogobenchimol@gmail.com)  Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro, 87, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/10253890.2023.2265160>.

© 2023 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

Besides local morphological alterations, it has been observed that chronic stress also affects normal alimentary behavior (Yau & Potenza, 2013). With the increase in glucocorticoid in the bloodstream after stress stimuli, the search for pleasurable activities (such as sugar and fat ingestion or drugs) increases (Dallman et al., 2003). Some studies suggest that consuming comfort foods during stress periods may attenuate endocrine imbalance and anxiety-like symptoms (Ortolani et al., 2011; Yau & Potenza, 2013).

Thus, this study aimed to investigate structural changes in the bladder of chronically stressed rats. Further, we studied the food preference (standard or comfort foods) and its effects on the bladder morphology of chronically stressed rats. The current study hypothesized that (i) chronic stress would alter bladder wall and epithelium morphology; (ii) stressed animals would prefer comfort food over standard food; and (iii) comfort food intake would prevent stress-induced bladder morphological alterations.

## Materials and methods

Thirty-two male Wistar rats were used in this study. All animals were bred in the Urogenital Research Unit animal facilities, kept in a room with a controlled temperature ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) and artificial dark-light cycles (lights on from 7:00 am to 7:00 pm), and had free access to standard rat chow and water. Animals were housed with 3 or 4 animals per cage ( $>340\text{cm}^2$  per animal). This study was approved by our local ethics committee (protocol number CEUA-004/2019) and followed national and international regulations on experimental animal use.

When the animals reached 10 weeks of age, they were included in the experiment. The experimental design was the same as described by Marchon et al. (2023). Four experimental groups, each consisting of eight rats, were randomly assigned as follows: control group (C); stressed group (S); control + comfort food group (C+CF); and stressed + comfort food group (S+CF).

Groups C and S received only standard rat chow (Nuvilab CR-1, Quimtia, Colombo, Brazil), while groups C+CF and S+CF received Froot Loops (Kellogg Brazil, São Paulo, Brazil) in addition to the standard rat chow. Froot Loops was used as comfort food because it is mainly composed of simple carbohydrates, as well as being very attractive and easy to gnaw. Its nutritional characteristics are listed in supplementary Table 1. For all groups, the standard chow present in each cage was weighed daily and replenished to 50 g per animal. In addition to the standard chow, groups C+CF and S+CF received 30 g of Froot Loops per rat, and its consumption was also weighed daily. Food intake (measured as grams) calories intake (measured as Kilocalories per body mass) and food preference (percentage of consumption in grams; for groups C+CF and S+CF) were calculated and compared among the groups. Capillary blood glucose was measured, using an appropriate glucometer (Accucheck performa, Roche, São Paulo, Brazil), at the beginning and at the end of the study. To do this, the animals underwent an eight-hour fasting and the caudal vein was punctured to collect blood samples.

Animals in groups S and S+CF were submitted to a chronic stress protocol using the restriction of movements method (Benchimol de Souza et al., 2011; de Souza et al., 2012). Each animal was placed in a rigid opaque plastic tube to restrain its movements, 2 h daily (from 17:00 to 19:00), for 8 weeks. Tubes with different diameters and lengths were adjusted weekly depending on the animal's size. On the other hand, the control groups (C and C+CF) were kept under normal conditions and not subjected to any stress procedure; nevertheless, food was removed during the same period as the stressed groups (2 h daily) to avoid any bias in food intake measurements.

After eight weeks of experiments, the animals were weighed and euthanized by isoflurane (Isoflurano, BioChimico, Itatiaia, Brazil) inhalation in an induction chamber (Procópio et al., 2021). The bladder was dissected, and its middle portion was fixed by immersion in a 4% buffered formaldehyde solution. The bladder fundus and neck portion were avoided since the muscle fibers in these portions have different characteristics and dispositions. Subsequently, samples were routinely processed for paraffin embedding, and  $5\mu\text{m}$  thick sections were used for histomorphometric evaluations (Ribeiro et al., 2014).

The surface density ( $S_v$ ) of bladder wall components (Smooth muscle, connective tissue, and elastic system fibers) was evaluated using images captured under 600x or 1000x magnification by a digital camera (DP70, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a microscope (BX51, Olympus). Masson's trichrome stained sections were analyzed for smooth muscle and connective tissue surface densities, while Weigert's resorcin fuchsin stained sections were used to analyze the surface density of elastic system fibers. The surface density was calculated (for each structure) by the point counting method (Baddeley et al., 1986; Felix-Patrcio et al., 2015). Briefly, a 100-point grid was superimposed over the images using the Image J software (version 1.45s, National Institutes of Health, Bethesda, USA), and each structure "touched" by a point was counted. The result, expressed as a percentage, was calculated after measuring 25 images from different randomly captured fields for each animal, for each  $S_v$  analysis (Da Silva et al., 2020; Felix-Patrcio et al., 2015). Results are expressed as a percentage, calculated by the number of points that superimpose each bladder component (Baddeley et al., 1986; Ribeiro et al., 2014).

The epithelial height was measured at a final magnification of X600 of Masson's trichrome-stained sections. The "straight line" tool of ImageJ software was used for this purpose after the program was calibrated for absolute values. Epithelial height, expressed in  $\mu\text{m}$ , was measured in different locations per field, resulting in 50 measures per animal (Ribeiro et al., 2014). The mean of these values was considered the epithelial height of the animal.

All data were tested for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. A two-way ANOVA was performed to analyze the effect of Stress and Comfort food on the morphological bladder parameters. Tukey's multiple comparisons test was used for determining between-groups differences. The Student's t-test was used to analyze food preference. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

Additionally, all results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, San Diego, USA).

## Results

The body mass and capillary blood glucose levels were similar among all groups at the beginning and the end of the study. Two-way ANOVA revealed that there was no statistically significant effect of stress, comfort food or the interaction for these parameters. Chronic stress did not have a statistically significant effect on food intake ( $p=0.0515$ ) or on calories intake ( $p=0.1819$ ). However, simple main effects analysis showed that comfort food did have a statistically significant effect on food intake calculated in grams ( $p=0.0004$ ) or in kcal/kg of body mass ( $p=0.0495$ ). Animals with access to comfort food consumed  $25.16 \text{ g} \pm 1.91$ , less than groups without access to comfort food, which consumed  $27.79 \text{ g} \pm 0.03$ . Post-hoc test showed differences between groups S vs. S+CF ( $p=0.0009$ ), and C+CF vs. S+CF ( $p=0.0324$ ). Meanwhile, the calories intake, calculated in kcal/kg of body mass, was higher in animals with access to comfort foods ( $0.26 \text{ kcal/kg} \pm 0.02$ ) than those without access ( $0.24 \text{ kcal/kg} \pm 0.01$ ). Also, there was a statistically significant interaction between the effects of stress and comfort food on food intake, calculated in grams ( $p=0.0449$ ).

For both groups that had access to comfort food (C+CF and S+CF), Froot Loops were preferred over standard chow. Animals in group C+CF the food intake was 63.4% of comfort food, and 36.5% of standard chow. However, in group S+CF the preference for Froot Loops was even higher; food intake was 69.1% of comfort food, and 30.9% of standard chow. When comparing these results, it was observed that stressed animals consumed more comfort food than non-stressed animals.

### Effects of stress on vesical wall

Regarding the vesical wall morphometry, it was observed that chronic stress induced some modifications. Simple main effects analysis showed that stress did have a statistically significant effect on smooth muscle surface density ( $p=0.0005$ ), connective tissue surface density ( $p=0.0005$ ), elastic system fiber surface density ( $p=0.0013$ ), and epithelial height ( $p<0.0001$ ).

Smooth muscle surface density was reduced from  $36.39\% \pm 1.69$  in non-stressed animals to  $33.24\% \pm 1.00$  in stressed animals. Post-hoc test showed difference between group C vs. S ( $p=0.0007$ ). Meanwhile, connective tissue was increased in stressed groups ( $66.76\% \pm 1.00$ ) in comparison to control groups ( $63.21\% \pm 1.69$ ) as represented in Figure 1. Again, post-hoc test showed difference between group C vs. S ( $p=0.0007$ ).

The elastic system fiber surface density was also increased, from  $2.99\% \pm 0.70$  in control groups to  $3.71\% \pm 0.89$  in stressed groups, as shown in Figure 2. Post-hoc test showed difference between group C vs. S ( $p=0.0271$ ). The epithelial

height was also increased by chronic stress. Control animals showed a mean of  $19.58 \mu\text{m} \pm 0.03$  while stressed animals had  $26.10 \mu\text{m} \pm 0.09$  of epithelial height. Figure 3 illustrates these findings. Post-hoc test showed differences between groups C vs. S ( $p=0.0136$ ), and C+CF vs. S+CF ( $p=0.0122$ ). All numerical data are presented in Table 1.

### Effects of comfort food on vesical wall

The effects of comfort food on bladder morphology were less drastic. Simple main effects analysis showed that comfort food did have a statistically significant effect on elastic system fiber surface density ( $p<0.0001$ ). For this parameter, a decrease from  $3.92\% \pm 0.60$  in animals receiving only standard chow to  $2.79\% \pm 0.41$  in animals with access to comfort food was observed. Post-hoc test showed differences between groups C vs. C+CF ( $p=0.0078$ ), and S vs. S+CF ( $p=0.0006$ ).

Meanwhile, comfort food did not have a statistically significant effect on smooth muscle surface density ( $p=0.55$ ), connective tissue surface density ( $p=0.55$ ), and epithelial height ( $p=0.95$ ).

### Interaction effects between comfort food and stress on vesical wall

The two-way ANOVA revealed that there was a statistically significant interaction between the effects of stress and comfort food on smooth muscle surface density ( $p=0.024$ ), and connective tissue surface density ( $p=0.024$ ).

The interaction effects between the effects of stress and comfort food were not statistically significant for elastic system fiber surface density ( $p=0.50$ ), and epithelial height ( $p=0.97$ ).

## Discussion

The current study showed that chronic stress promotes structural modifications in the bladder, altered the food preference and investigated the effects of this dietary modifications on the bladder morphology of stressed rats. The bladder of stressed animals had an increase of connective tissue, elastic system fibers, and epithelial height, while detrusor musculature was decreased. Although both non-stressed and stressed animals preferred to consume comfort food over standard chow, this preference was more notable in chronically stressed animals. The consumption of comfort food was associated to a reduction in bladder elastic system fibers.

It is well known that chronic stress leads to functional and morphological alterations of the urogenital organs (Marchon et al., 2018; Ribeiro et al., 2018, 2019). There is robust evidence showing that psychological stress negatively influences bladder function (Chess-Williams et al., 2021). However, the relationship between chronic stress and bladder morphology has not been fully studied. Chang et al. (2009) demonstrated that the bladders of stressed mice suffer a remodeling process with increased organ proportional mass. Further, Mann et al. (2015) confirmed this bladder mass increase in stressed

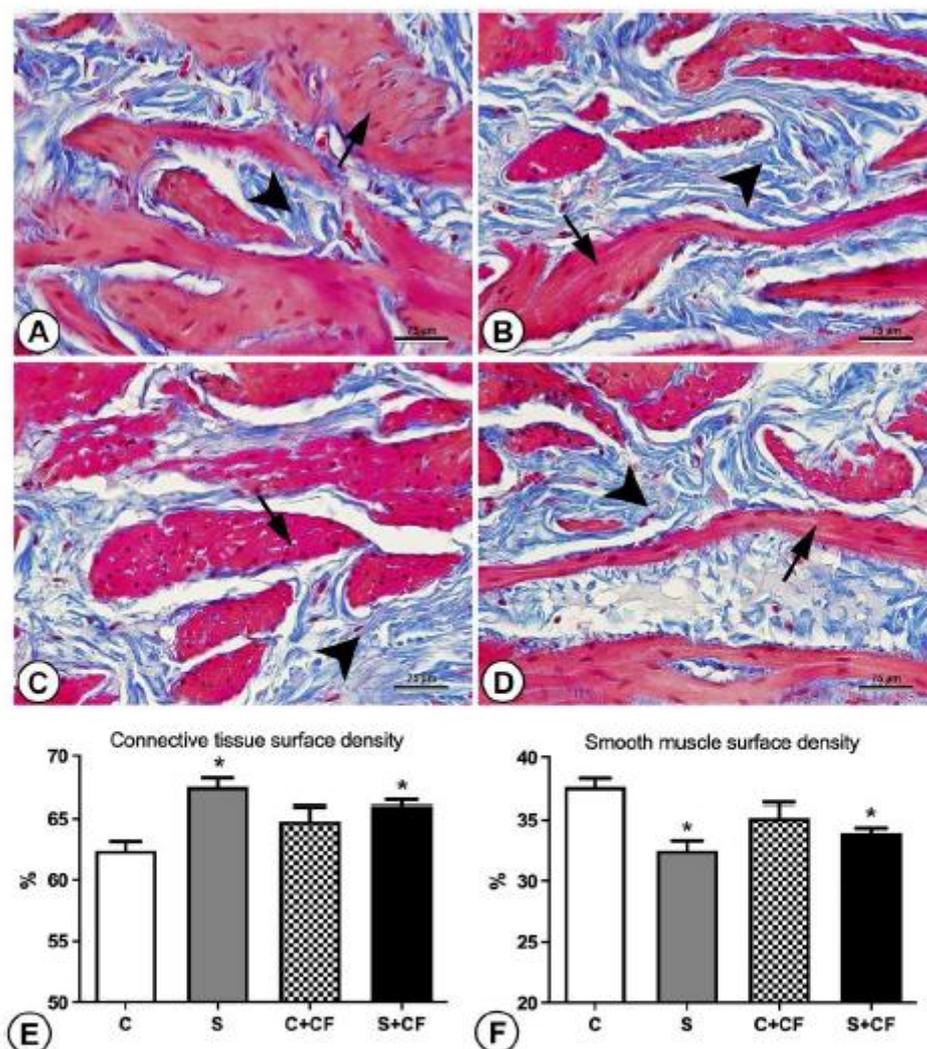


Figure 1. Photomicrographs and graphics representing the connective tissue (shown in blue and pointed by arrowheads) and smooth muscle contents (shown in Pink and pointed by arrows) in the bladder wall of different groups. (A) Control group (B) Stressed group (C) Control+comfort food group (D) Stressed+comfort food group. Sections were stained using Masson's trichrome and captured under 600 $\times$  magnification. The higher presence of connective tissue (blue stained areas) indicates tissue fibrosis. (E) Connective tissue surface density, (F) smooth muscle surface density. Asterisks represents statistical differences ( $p=0.0005$ ) between stressed and control animals. Scale bar represents 75  $\mu$ m.

mice, also showing that stress promoted the thickening of the bladder wall. The present study is the first to examine the proportional contents of the bladder wall after an animal model of chronic stress.

One of the most noticeable findings in the current study was the increase of connective tissue and decrease of smooth muscle fibers in stressed animals, what indicates bladder fibrosis as a consequence of stress stimuli. Bladder fibrosis is

a feature of bladder wall morphology that accompanies many benign lower urinary tract conditions (Fry et al., 2018). The release of inflammatory factors is considered one of the initial disruptors that initiate increased collagen production. In this regard, there is evidence of increased inflammatory responses to stress systemically (Cheng et al., 2015) and locally on the bladder (Merrill et al., 2013). This increased release of inflammatory mediators due to stress has also

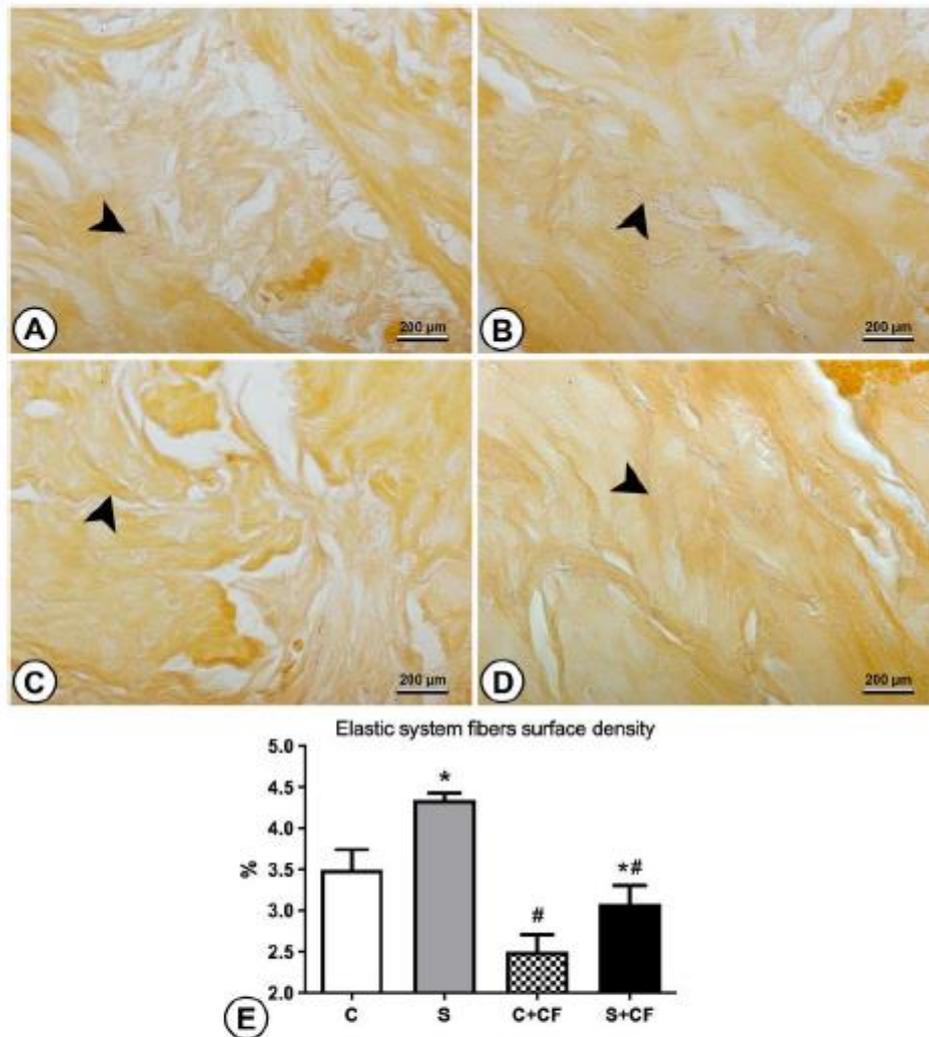


Figure 2. Photomicrographs and graphics representing the elastic system fibers (shown as fine purple lines and pointed by arrowheads) in the bladder wall of different groups. (A) Control group (B) Stressed group (C) Control+comfort food group (D) Stressed+comfort food group. Sections were stained using Weigert's resorcin fuchsin and captured under 1000 $\times$  magnification. (E) Results of elastic system fibers surface density. Asterisks represents statistical differences ( $p=0.0013$ ) between stressed and control animals. Hashtag represents statistical differences ( $p<0.0001$ ) between comfort food and standard chow fed animals. Scale bar represents 200 $\mu$ m.

been linked to changes in bladder function, with increased micturition frequency (Merrill et al., 2013; Pierce et al., 2016).

Another interesting finding of the present study was the elevated proportional content of elastic system fibers in stressed animals. Elastic fibers are the major component of the extracellular matrix involved in bladder elasticity (Nagatomi et al., 2004; Ribeiro et al., 2014). The increase in extracellular matrix components, including elastic system

fibers, in the bladder wall may lead to increased resistance for detrusor muscle relaxation, thereby diminishing compliance. Thus, the significant increase in elastic system fibers observed in this study may explain the increased urinary frequency and urgency observed in stressed animals and patients (Chess-Williams et al., 2021; Merrill et al., 2013).

The increase in connective tissue (including collagen and elastic system fibers) deposited in the bladder wall may lead

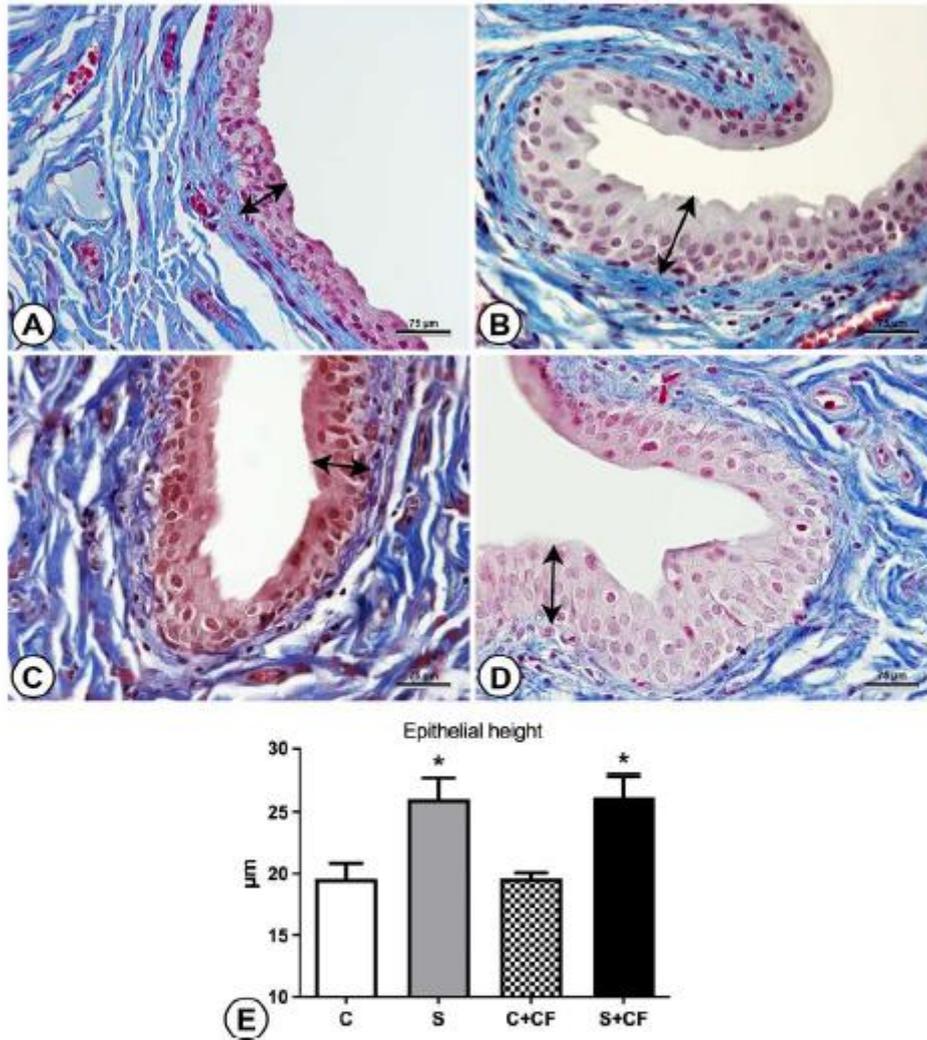


Figure 3. Photomicrographs and graphics representing the epithelial height in the bladder of different groups. The epithelium is marked (in random areas) by double-headed arrows to indicate the differences in epithelial height. (A) Control group (B) Stressed group (C) Control+comfort food group (D) Stressed+comfort food group. Sections were stained using Masson's trichrome and captured under 600 $\times$  magnification. (E) Results of epithelial height measurements. Asterisks represent statistical differences ( $p < 0.0001$ ) between stressed and control animals. Scale bar represents 75  $\mu\text{m}$ .

to a stiffer bladder wall resulting in reduced filling compliance (Fry et al., 2018). As in other conditions (Metcalf et al., 2010), it is possible to believe that bladder fibrosis begins with an inflammatory process after stress stimuli and ends in voiding symptoms.

The increased thickness of bladder epithelium may, at least partially, explain the previous findings of increased bladder wall thickness in stressed animals (Mann et al., 2015). Proliferative factors were reported to be over-expressed in

the bladder of stressed animals, and this could locally induce epithelial growth in response to stress stimuli (de Rijk et al., 2022; Merrill et al., 2013). These results confirm the hypothesis that chronic stress would alter bladder wall and epithelium morphology.

As expected, animals with access to comfort foods preferred it over standard chow. Nonetheless, it was interesting that stressed animals showed a higher preference to consume comfort foods. As previously mentioned, high palatability and

Table 1. Biometric data and bladder morphometric analysis of the experimental groups.

	C	S	C+CF	S+CF	p value*	p value**
Blood glucose – initial (mg/dL)	89.25±9.19	98.63±13.21	95.38±14.69	89.29±11.88	0.7162	0.7221
Blood glucose – final (mg/dL)	89.19±7.95	96.13±13.67	99.71±13.41	90.57±8.88	0.7914	0.5520
Body mass – initial (g)	319.1±57.85	348.0±29.63	373.0±41.24	313.4±24.90	0.2923	0.5054
Body mass – final (g)	388.10±70.45	378.60±43.53	388.10±70.45	364.90±34.29	0.0648	0.5443
Food intake (g)	27.77±1.69	27.81±1.95	26.51±2.04	23.81±1.67	0.0515	0.0004
Food intake (kcal/kg BM)	0.24±0.01	0.24±0.02	0.27±0.03	0.25±0.03	0.1819	0.0495
Food preference (g)	–	–				
			SC	CF	SC	CF
			9.69±0.95	16.81±1.51	7.36±1.69	16.45±1.89
Sv [smooth muscle] (%)	37.58±2.05	32.53±2.14	35.19±3.26	33.95±1.07	<0.0001	<0.0001
Sv [connective tissue] (%)	62.42±2.05	67.47±2.14	64.81±3.26	66.05±1.07	0.0005	0.5507
Sv [elastic system fibers] (%)	3.50±0.69	4.34±0.25	2.50±0.57	3.08±0.64	0.0013	<0.0001
Epithelial height (µm)	19.55±3.58	26.04±4.86	19.60±1.37	26.17±4.89	<0.0001	0.9484

C: Control group; S: Stressed group; C+CF: Control+comfort food group; S+CF: Stressed+comfort food group; BM: Body mass. SC: Standard chow. CF: Comfort food. \*p value of stress effects. \*\*p value of food effects. †p value of t test regarding food preference of C+CF group. ‡p value of t test regarding food preference of S+CF group. Data expressed as mean±standard deviation.

high caloric food intake increase during stressful situations (Dallman et al., 2003). This study's results corroborate these arguments and confirm the hypothesis that stressed animals would prefer comfort food intake rather than standard chow.

Another hypothesis raised was that comfort food intake would ameliorate stress-induced bladder morphological alterations. This hypothesis was based on previous studies which had shown that the elevated serum corticosterone after induced stress is attenuated when rats had access to comfort food (Ortolani et al., 2011). Corticosterone could be implicated in physiological and morphological modifications associated with stress; hence, it was reasonable to raise the mentioned hypothesis. In this study, we found that access to comfort food only prevented stress-induced modification in the proportion of elastic system fibers. Specifically, this parameter was found to be lower in group C+CF compared to group C. This suggests that comfort food intake may specifically reduce the proportion of elastic system fibers regardless of stress stimuli. For smooth muscle and connective tissue surface densities, the results of groups C+CF and S+CF were similar, denoting that when using comfort foods, there were no stress-induced bladder alterations. However, for these parameters, the results of groups S and S+CF were also statistically similar, clearly indicating that no protective effect was achieved by comfort food intake. Overall, these results show that access to comfort food does not ameliorate (or worsen) stress-induced bladder morphological alterations.

There is increasing evidence that chronic stress can result in the development of lower urinary tract symptoms such as urinary frequency, urgency, incontinence, and pelvic pain. Chess-Williams et al. (2021) raised important questions regarding the treatment of urinary symptoms induced by chronic stress. Anxiolytics and other psychiatric drugs reduce stress-induced behavioral changes with minimal effects on voiding symptoms (Chess-Williams et al., 2021). On the other hand, traditional drugs used for detrusor overactivity (oxybutynin and mirabegron) ameliorated urinary symptoms without affecting behavior. As chronic stress induces morphological alterations of the bladder wall, the treatment goal should be restoring normal bladder wall morphology, which may not be achieved using any of the drugs mentioned. Studying other urogenital organs (penis, testes, and kidneys) has shown that stress stimuli removal promotes either the recovery of the

stress-induced morphological modifications or the interruption of disease progression (Marchon et al., 2018; Ribeiro et al., 2018, 2019). These results, in some way, corroborate the positive results obtained with mindfulness, hypnosis, and yoga for treating stress-related urinary symptoms (Chess-Williams et al., 2021). Future studies investigating the effects of stress-stimuli removal on bladder morphological modifications are warranted to elucidate this topic further.

This study has some limitations. Froot loops was chosen as a comfort food because it is mainly composed of simple carbohydrates, but other types of comfort foods (high fat and/or high sucrose foods) could be used as well. This does not isolate the individual effect of simple carbohydrates or lipids but reflects the usual comfort food consumed. As an experimental study, the results obtained reflect only the tested conditions and may not be directly transposed to other conditions (types of stressors, species, diets, etc.) that are different from the experiments conducted. Additionally, animals from control groups were not handled daily (as animals from stressed groups were), thus the effects observed could be not only due to the tube restraint stress but also due to the daily handling of the animals which was necessary to perform the study. One other aspect that should be considered is that we used only male rats in this study. The influences of chronic stress on the female bladder may be different than what was observed in males, and the differences in how comfort foods impact female food behaviors should also be considered. Nevertheless, the results of the present study help to understand some aspects of the biology of stress, its effects on bladder morphology, and its relation to lower urinary tract symptoms.

## Conclusion

Chronic stress resulted in morphological alterations in the bladder wall and epithelium, which may be related to lower urinary tract symptoms. Stressed animals showed an increased preference for consuming comfort foods; however, this feeding pattern did not ameliorate or worsen the bladder alterations caused by chronic stress.

## Acknowledgments

This study was supported by grants from the Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), the Coordination for the Improvement of

Higher Education Personnel (CAPES), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). These foundations were not involved in the study design, data collection, analysis, and interpretation, drafting of the manuscript, and the decision to submit for publication.

### Disclosure statement

The authors declare no conflicts of interest.

### Funding

Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

### Notes on contributors

**Roger G. Marchon** is a recently graduated PhD in the Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro. This manuscript is part of his thesis.

**Bianca M. Gregório** is an associate Professor in the Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro. Her work mainly focuses on nutritional aspects related to the urogenital organs.

**Marco A. Pereira-Sampaio** is an associate Professor at the Department of Morphology, Federal Fluminense University and a collaborator at the Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro. His work focuses on morphological aspects of animal models.

**Waldemar S. Costa** is an emeritus Professor in the Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro. His work mainly focuses on histological and morphometrical evaluation of the urogenital organs.

**Francisco J. Sampaio** is a full Professor, and head of the Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro. His work investigates the morphological aspects of the urogenital system at normal and altered conditions in humans and animal models.

**Diogo B. De Souza** is an associate Professor in the Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro. He has been dedicated to study the urogenital organs under different conditions in animal models. Among his research lines, one is to study the impact of chronic stress on the kidney, testis, penis, and bladder.

### ORCID

Roger G. Marchon  <http://orcid.org/0000-0003-0090-5144>  
 Bianca M. Gregório  <http://orcid.org/0000-0001-8138-7734>  
 Marco A. Pereira-Sampaio  <http://orcid.org/0000-0003-2574-7058>  
 Waldemar S. Costa  <http://orcid.org/0000-0002-6479-1804>  
 Francisco J. Sampaio  <http://orcid.org/0000-0001-9087-9319>  
 Diogo B. De Souza  <http://orcid.org/0000-0003-3456-5029>

### References

- Baddeley, A. J., Gundersen, H. J., & Cruz-Orive, L. M. (1986). Estimation of surface area from vertical sections. *Journal of Microscopy*, 142(Pt 3), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1986.tb04282.x>
- Benchimol de Souza, D., Silva, D., Marinho Costa Silva, C., Barcellos Sampaio, F. J., Silva Costa, W., & Martins Cortez, C. (2011). Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: A morphometrical and stereological analysis. *Kidney & Blood Pressure Research*, 34(6), 424–429. <https://doi.org/10.1159/000328331>
- Chang, A., Butler, S., Sliwoski, J., Valentino, R., Canning, D., & Zderic, S. (2009, October). Social stress in mice induces voiding dysfunction and bladder wall remodeling. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 297(4), F1101–F1108. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90749.2008>
- Cheng, Y., Jope, R. S., & Baurer, E. (2015, May 7). A pre-conditioning stress accelerates increases in mouse plasma inflammatory cytokines induced by stress. *BMC Neuroscience*, 16(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0169-z>
- Chess-Williams, R., McDermott, C., Sellars, D. J., West, E. G., & Mills, K. A. (2021, October). Chronic psychological stress and lower urinary tract symptoms. *Lower Urinary Tract Symptoms*, 13(4), 414–424. <https://doi.org/10.1111/luts.12395>
- Da Silva, M. H. A., Medeiros, J. L., Jr, Costa, W. S., Sampaio, F. J. B., & De Souza, D. B. (2020, December). Effects of the dutasteride and sildenafil association in the penis of a benign prostatic hyperplasia animal model. *The Aging Male*, 23(5), 1009–1015. <https://doi.org/10.1080/13685538.2019.1653839>
- Dallman, M. F., Pecoraro, N., Akana, S. F., La Flour, S. E., Gomez, F., Houshyar, H., Bell, M. E., Bhatnagar, S., Laugero, K. D., & Manalo, S. (2003). Chronic stress and obesity: A new view of "comfort food." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11696–11701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1934666100>
- de Rijk, M. M., Wolf-Johnston, A., Kullmann, A. F., Maringer, K., Sims-Lucas, S., van Koevening, G. A., Rodriguez, L. V., & Birdier, L. A. (2022, December). Stress-induced changes in trophic factor expression in the rodent urinary bladder: Possible links with angiogenesis. *International Neurourology Journal*, 26(4), 299–307. <https://doi.org/10.5213/inj.2244118.059>
- de Souza, D. B., Silva, D., Cortez, C. M., Costa, W. S., & Sampaio, F. J. (2012, July–August). Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *Journal of Andrology*, 33(4), 735–739. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014225>
- Felix-Patricio, B., De Souza, D. B., Gregório, B. M., Costa, W. S., & Sampaio, F. J. (2015). How to quantify penile corpus cavernosum structures with histomorphometry: Comparison of two methods. *BioMed Research International*, 2015, 832156–832156. <https://doi.org/10.1155/2015/832156>
- Felix-Patricio, B., Medeiros, J. L., Jr, De Souza, D. B., Costa, W. S., & Sampaio, F. J. (2015). Penile histomorphometrical evaluation in hypertensive rats treated with sildenafil or enalapril alone or in combination: A comparison with normotensive and untreated hypertensive rats. *The Journal of Sexual Medicine*, 12(1), 39–47. <https://doi.org/10.1111/jsm.12750>
- Fry, C. H., Kitney, D. G., Panikar, J., Drake, M. J., Kanai, A., & Andersson, K. E. (2018, June). Fibrosis and the bladder, implications for function ICI-RS 2017. *Neurourology and Urodynamics*, 37(S4), S7–S12. <https://doi.org/10.1002/nuu.23725>
- Mann, E. A., Alam, Z., Hufgard, J. R., Mogle, M., Williams, M. T., Vorhaes, C. V., & Roddy, P. (2015, October 15). Chronic social defeat, but not restraint stress, alters bladder function in mice. *Physiology & Behavior*, 150, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.021>
- Marchon, R. G., Gregório, B. M., Costa, W. S., Pereira-Sampaio, M. A., Sampaio, F. J., & De Souza, D. B. (2023). Effects of comfort food diet on the penile morphology of stressed rats. *Heliyon*, 9(6), e17013. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17013>
- Marchon, R. G., Ribeiro, C. T., Costa, W. S., Sampaio, F. J. B., Pereira-Sampaio, M. A., & de Souza, D. B. (2018). Immediate and late effects of stress on kidneys of prepubertal and adult rats. *Kidney & Blood Pressure Research*, 43(6), 1919–1926. <https://doi.org/10.1159/000496004>
- Merrill, L., Malley, S., & Vizzard, M. A. (2013, July 15). Repeated variate stress in male rats induces increased voiding frequency, somatic sensitivity, and urinary bladder nerve growth factor expression. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 305(2), R147–R156. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00089.2013>
- Metcalfe, P. D., Wang, J., Jiao, H., Huang, Y., Hori, K., Moore, R. B., & Tredget, E. E. (2010, December). Bladder outlet obstruction: progression from inflammation to fibrosis. *BJU International*, 106(11), 1686–1694. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2010.09445.x>
- Nagatomi, J., Gloeckner, D. C., Chancellor, M. B., DeGroat, W. C., & Sacks, M. S. (2004). Changes in the biaxial viscoelastic response of the urinary

- bladder following spinal cord injury. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(10), 1409–1419. <https://doi.org/10.1114/babme.0000042228.89106.48>
- Ortolani, D., Oyama, L. M., Ferrari, E. M., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2011). Effects of comfort food on food intake, anxiety-like behavior and the stress response in rats. *Physiology & Behavior*, 103(5), 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.03.028>
- Pierce, A. N., Di Silvestro, E. R., Eller, O. C., Wang, R., Ryals, J. M., & Christianson, J. A. (2016, May 15). Urinary bladder hypersensitivity and dysfunction in female mice following early life and adult stress. *Brain Research*, 1639, 58–73. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.039>
- Proccópio, L. M., Pereira-Sampaio, M. A., Costa, W. S., Sampaio, F. J. B., & Souza, D. B. (2021, December 8). Histomorphometric comparison of the corpus cavernosum of rats submitted to euthanasia with ketamine and xylazine or isoflurane. *Acta Cirurgica Brasileira*, 36(11), e361103. <https://doi.org/10.1590/ACB361103>
- Ribeiro, C. T., Costa, W. S., Sampaio, F. J. B., Pereira Sampaio, M. A., & de Souza, D. B. (2019). Evaluation of the effects of chronic stress applied from the prepubertal to the adult stages or only during adulthood on penile morphology in rats. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 22(2), 248–255. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1553946>
- Ribeiro, C. T., De Souza, D. B., Costa, W. S., Sampaio, F. J. B., & Pereira-Sampaio, M. A. (2018). Immediate and late effects of chronic stress in the testes of prepubertal and adult rats. *Asian Journal of Andrology*, 20(4), 385–390. [https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_68\\_17](https://doi.org/10.4103/aja.aja_68_17)
- Ribeiro, G. S., Souza, D. B., Cortez, C. M., Silva, D., Costa, W. S., & Sampaio, F. J. (2014). Effects of prepubertal corticosterone treatment on urinary bladder. *Acta Cirurgica Brasileira*, 29(Suppl 3), 55–59. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502014001700011>
- Tynan, R. J., Naicker, S., Hinwood, M., Nalivaiko, E., Buller, K. M., Pow, D. V., Day, T. A., & Walker, F. R. (2010). Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(7), 1058–1068. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.02.001>
- Yau, Y. H., & Potenza, M. N. (2013). Stress and eating behaviors. *Minerva Endocrinol*, 38(3), 255–267.