



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Bruno Felix Patrício

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

Rio de Janeiro

2014

Bruno Felix Patrício

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

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

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Rio de Janeiro

2014

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

P314 Patrício, Bruno Félix.

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

Orientador: Diogo Benchimol de Souza.

Coorientador: Francisco José Barcellos Sampaio.

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

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

CDU 616.12-008.331.1:611.63

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

Assinatura

Data

Bruno Felix Patrício

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

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

Aprovado em 22 de outubro de 2014.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Carla Braga Mano Gallo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. João Paulo Martins de Carvalho
Hospital Federal Cardoso Fontes

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

A sorte favorece a mente bem preparada.

Louis Pasteur

RESUMO

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

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

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

Rato

ABSTRACT

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

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

Keywords: Erectile dysfunction. Hypertension. Morphology. Penis. Enalapril. Sildenafil. Rat

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
β	Beta
\times	Multiplicação
Na	Sódio
H ₂ O	Molécula da água
mmHg	Milímetro de Mercúrio
n	Número
=	Igual
\pm	Mais ou menos
°C	Graus Celsius
mg/kg/dia	Miligrama por quilo por dia
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
μm	Micrômetro
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
pH	Potencial de hidrogênio
h	Hora
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
dm ²	Decímetro quadrado
cm	Centímetro

SUMÁRIO

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

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

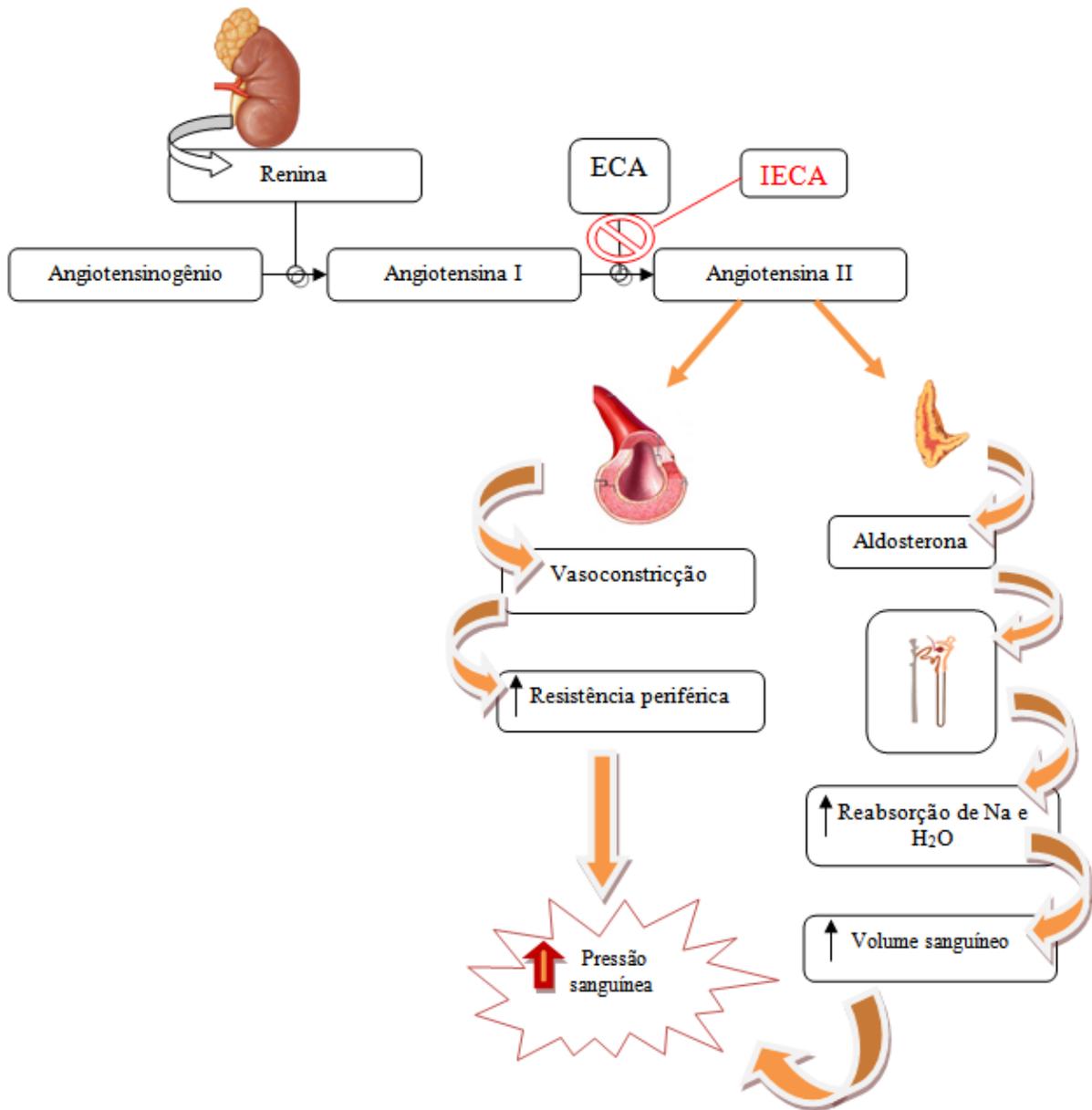
alguns diuréticos e beta-bloqueadores podem influenciar negativamente a função erétil. A enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores dos receptores da angiotensina e bloqueadores dos canais de cálcio têm sido relatados como classes de medicamentos que não trazem efeitos negativos, podendo,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

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

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

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

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



Legenda: A renina produzida nos rins converte o angiotensinogênio em angiotensina I. A enzima conversora de angiotensina (ECA) converte a angiotensina I em angiotensina II, que estimula a produção de aldosterona pela medula da glândula adrenal. Esta causa o aumento da reabsorção de Na e de H₂O nos túbulos contorcidos distais do rim, levando ao aumento do volume sanguíneo. Nos vasos sanguíneos, a angiotensina II causa a vasoconstrição, aumentando a resistência periférica. Assim, a angiotensina II leva ao aumento da pressão arterial tanto pela sua ação direta nos vasos sanguíneos quanto por ação indireta mediada pela adrenal. O inibidor da ECA (IECA) atua evitando a conversão da angiotensina I em angiotensina II, consequentemente reduzindo a pressão arterial.

Fonte: Marieb, 2009 modificado (25).

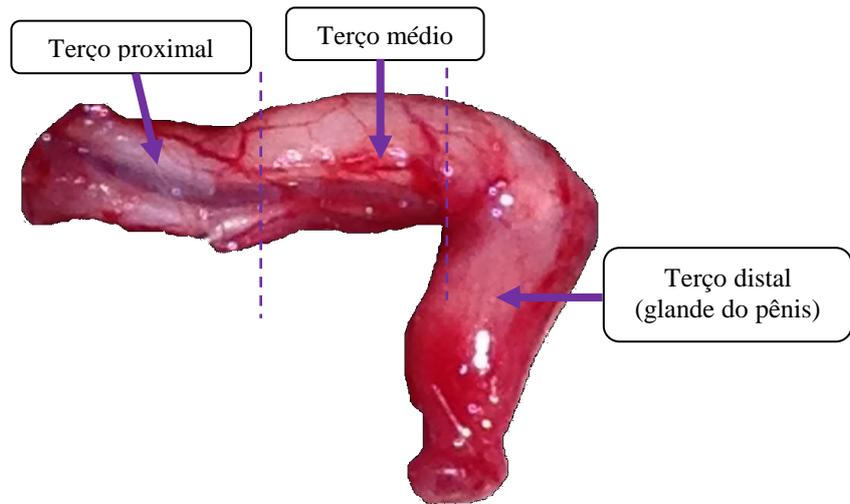
Tendo em vista que os inibidores de PDE5 atuam promovendo o relaxamento da musculatura lisa, foi sugerido que seu uso poderia diminuir a pressão arterial sistêmica, relaxando o músculo liso vascular de modo semelhante à sua ação no músculo liso dos corpos cavernosos. Alguns autores mostraram que o uso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

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

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

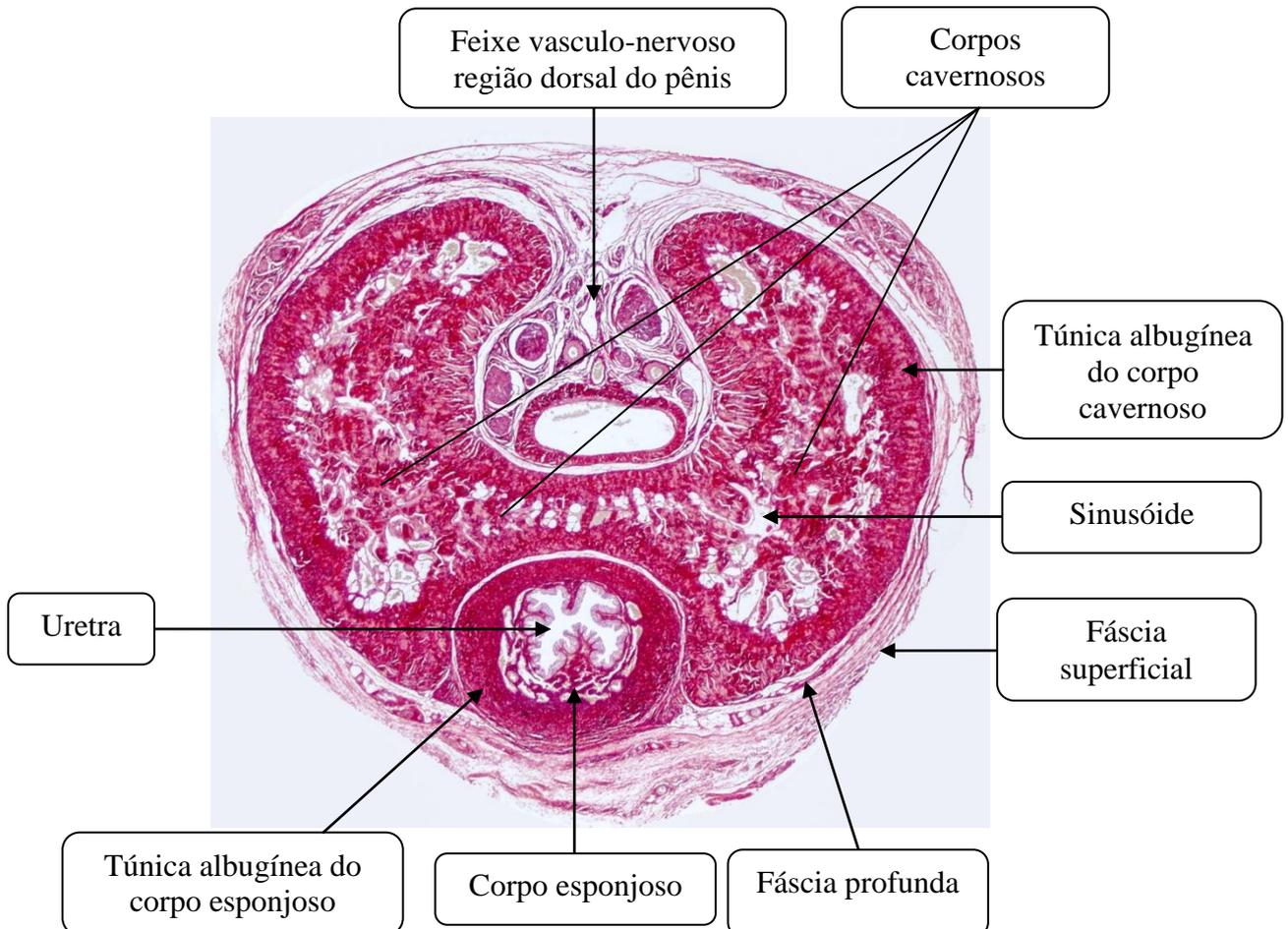
Diferente do pênis humano, os ratos possuem na glândula peniana, no terço distal uma estrutura osteocartilagínea. Por esta razão, a região peniana que possui as estruturas mais semelhantes ao pênis humano, embora com organização estrutural diferente, é o terço médio, e, portanto é esta região estudada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

Figura 2 – Divisão anatômica do pênis do rato.



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

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



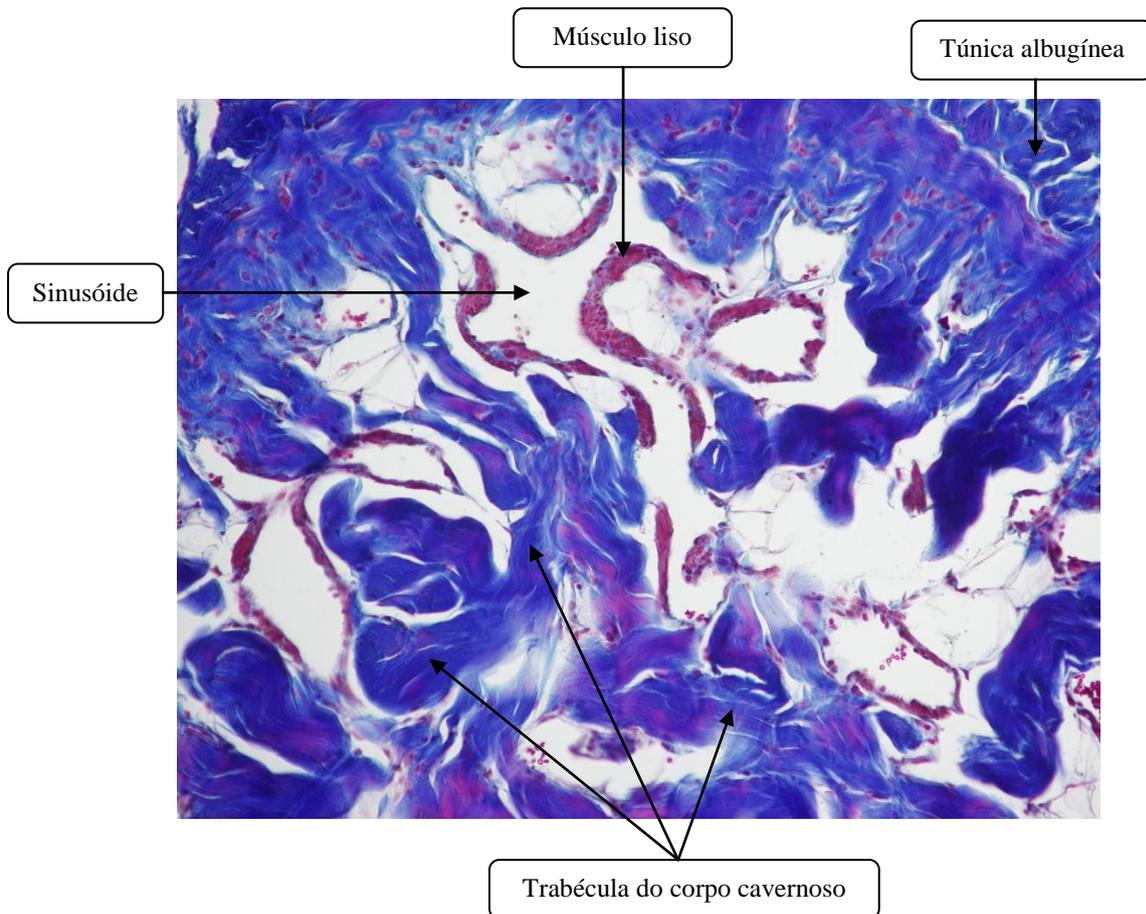
Legenda: Fotomicrografia dos principais componentes no corte transversal do terço médio do pênis de rato corado com vermelho de picosirius, objetiva de 2x.

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

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

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

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



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

Nota: Tricrômico de Masson, objetiva de 20x.

1 OBJETIVO

1.1 Objetivo geral

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

1.2 Objetivo específico

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

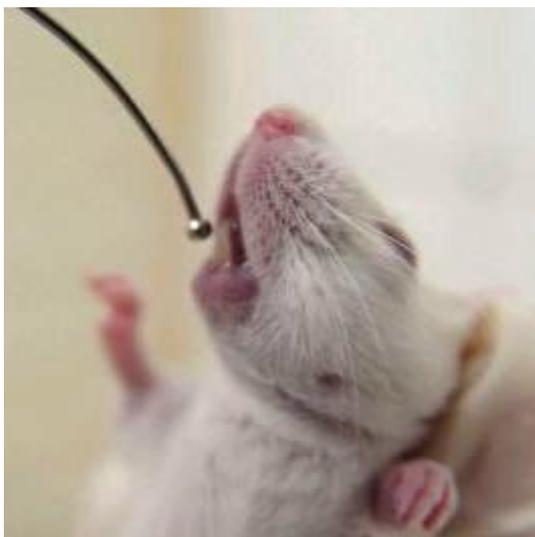
2.1 Modelo experimental

Foram utilizados 50 ratos (n=40 SHR e n=10 Wistar Kyoto) machos com 120 dias de vida, mantidos em biotério, com temperatura de 21 ± 1 °C, submetidos a controle de ciclo de 12h claro/escuro (luz artificial, 7:00 as 19:00 horas), recebendo ração comercial e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados na Unidade de Pesquisa Urogenital em conformidade com as orientações convencionais para a experimentação com animais. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram submetidos e aprovados no Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade Estadual do Rio de Janeiro com protocolo n°CEUA/051/2012 (ANEXO I).

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

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

Figura 5 – Procedimento de gavagem



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

2.2 Aferição da pressão arterial

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

Figura 6 – Aferição da pressão arterial por pletismografia



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

2.3 Eutanásia e procedimentos histológicos

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

2.3.1 Procedimentos histológicos

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

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

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

2.3.2 Imunohistoquímica

A imunomarcção foi realizada com o anticorpo primário policlonal anti-antígeno de proliferao nuclear celular (PCNA, o código de produto 13-3900, Invitrogen, Camarillo, EUA). Lâminas histológicas silanizadas, com cortes desparafinados hidratados e tratados com tampão ácido etilenodiamino tetra-acético (TRIS-EDTA), pH 9,0, *overnight* a 60°C por 12h para a recuperao de antígenos, e em seguida, tratada com soluo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em metanol durante 10 minutos para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Estes passos foram seguidos por lavagem dos cortes em tampão fosfato salino (PBS) e subseqüentemente incubado à temperatura ambiente com 10% de soro de cabra para bloquear a ligao inespecífica. Os cortes foram então incubados *overnight* a 4 ° C com o anticorpo primário anti-PCNA diluído em PBS com 1% de soro de albumina bovina (BSA), 1: 100. Os cortes foram lavados em PBS e incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos com anticorpo secundário específico (Zymed Laboratories, Inc., São Francisco, Califórnia, EUA). Após este processo, os cortes foram lavados em PBS, tratadas com líquido de diaminobenzidina (DAB) (Zymed Laboratories), e em seguida, contrastadas com hematoxilina. As laminas de controle negativo foram processadas através da substituio do anticorpo primário por PBS e não se observou qualquer indicao de marcao.

2.4 **Morfometria**

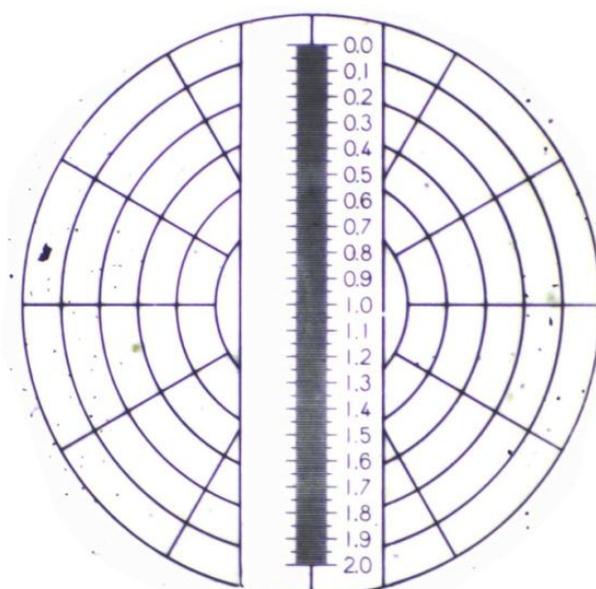
Embora descrio es de alterao es morfológicas sejam válidas em algumas circunstâncias específicas, para a maioria das situao es, os resultados científicos ganham valor quando expressos numericamente (39, 40). É com base nesta premissa que o uso de morfometria para a pesquisa médica se sustenta. A quantificao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

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

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

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

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



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

Nota: Régua milimetrada, objetiva de 2x.

2.4.1.1 Calibrando o *software image J*

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

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

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

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

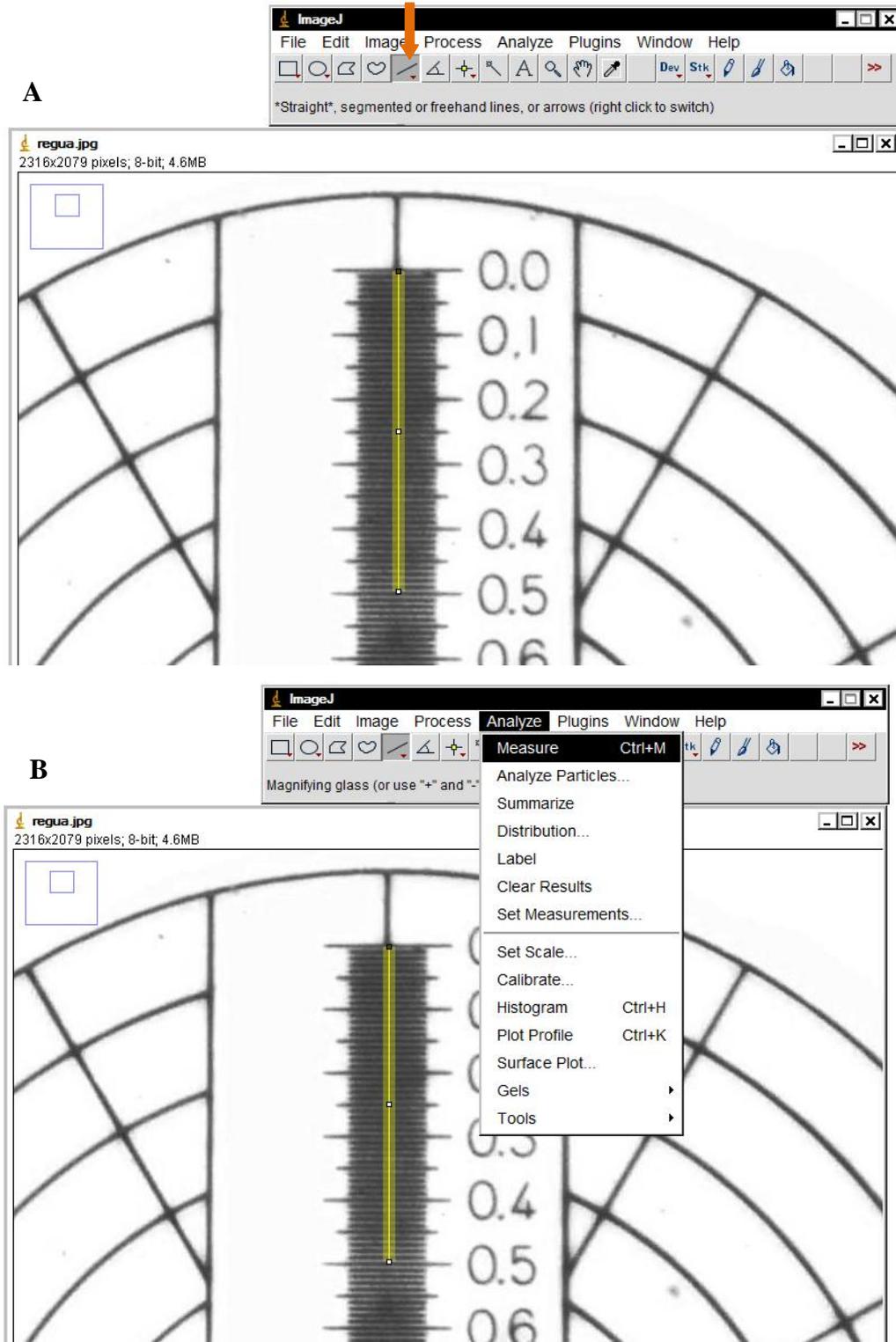
O software nos fornece a distância em pixels, e nós informamos ao software que aquela distância (comprimento) corresponde 0,5 mm, como citado no passo 2.

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

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

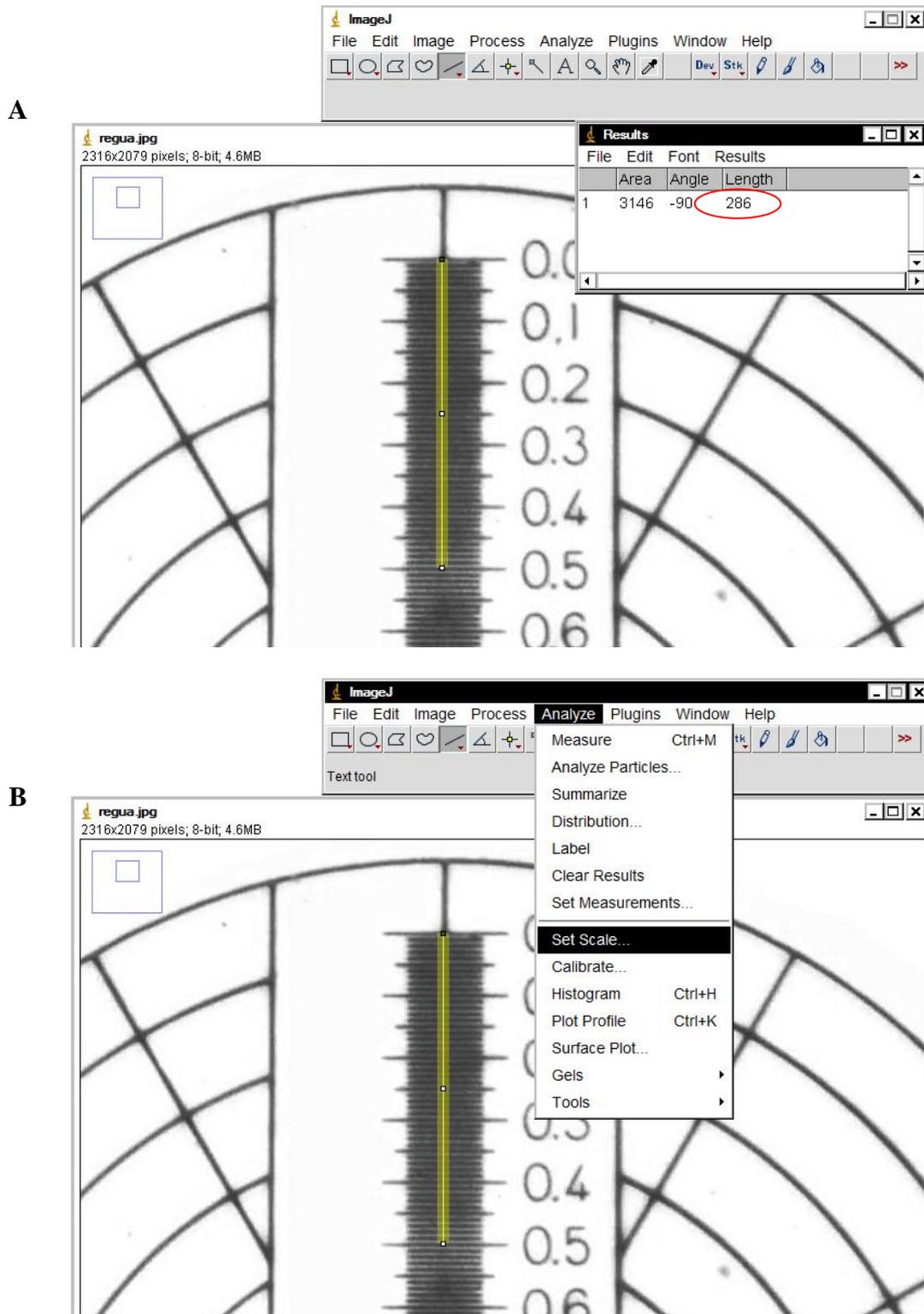
É importante ressaltar que o software está em inglês, portanto, a numeração deve ser preenchida utilizando ponto (.) como separador de casas decimais e não a vírgula. Caso utilize a vírgula verás que a calibração estará errada.

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

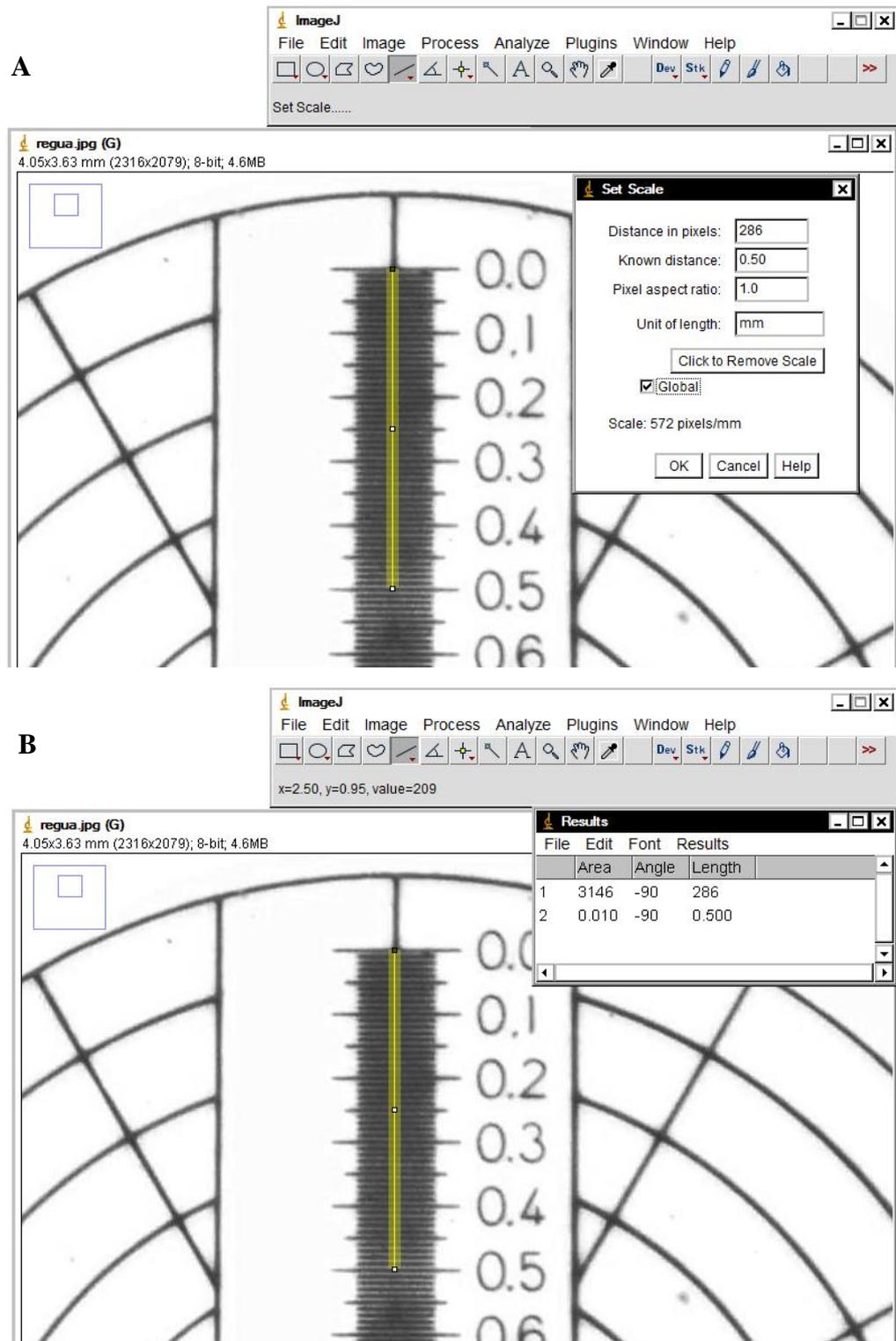


Legenda: Em A, o primeiro passo para calibrar o software em mm com a seleção da distância (comprimento) conhecida na régua (0,0 a 0,5 mm). A seta em laranja indica a ferramenta a ser usada para marcar o comprimento e em amarelo a linha reta, com a distância de 0,5mm, selecionada. Em B, os passos para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

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



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

Figura 10 – Configurando o software *Image J*

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

2.4.1.2 Análise das áreas dos cortes transversais

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

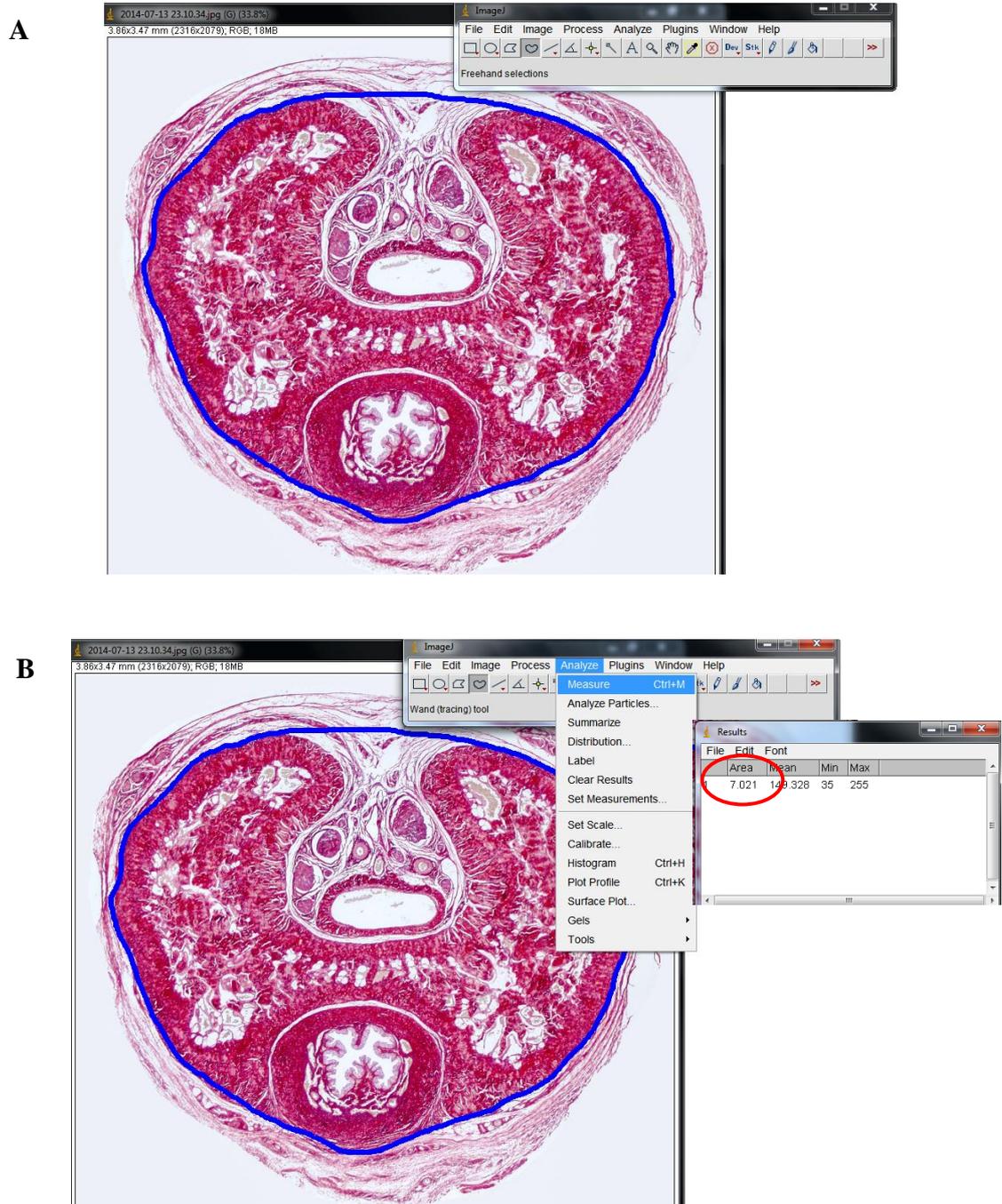
Ao terminar a marcação da área desejada foram selecionadas as opções *analyze*, *measure*. A janela *results* nos forneceu os valores referentes às áreas envolvidas em mm². O mesmo procedimento foi realizado para analisar todas as áreas dos cortes transversais (como ilustrado na Figura 11 B), com a exceção da área do corte transversal da túnica albugínea.

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

2.4.1.3 Análise da túnica albugínea

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

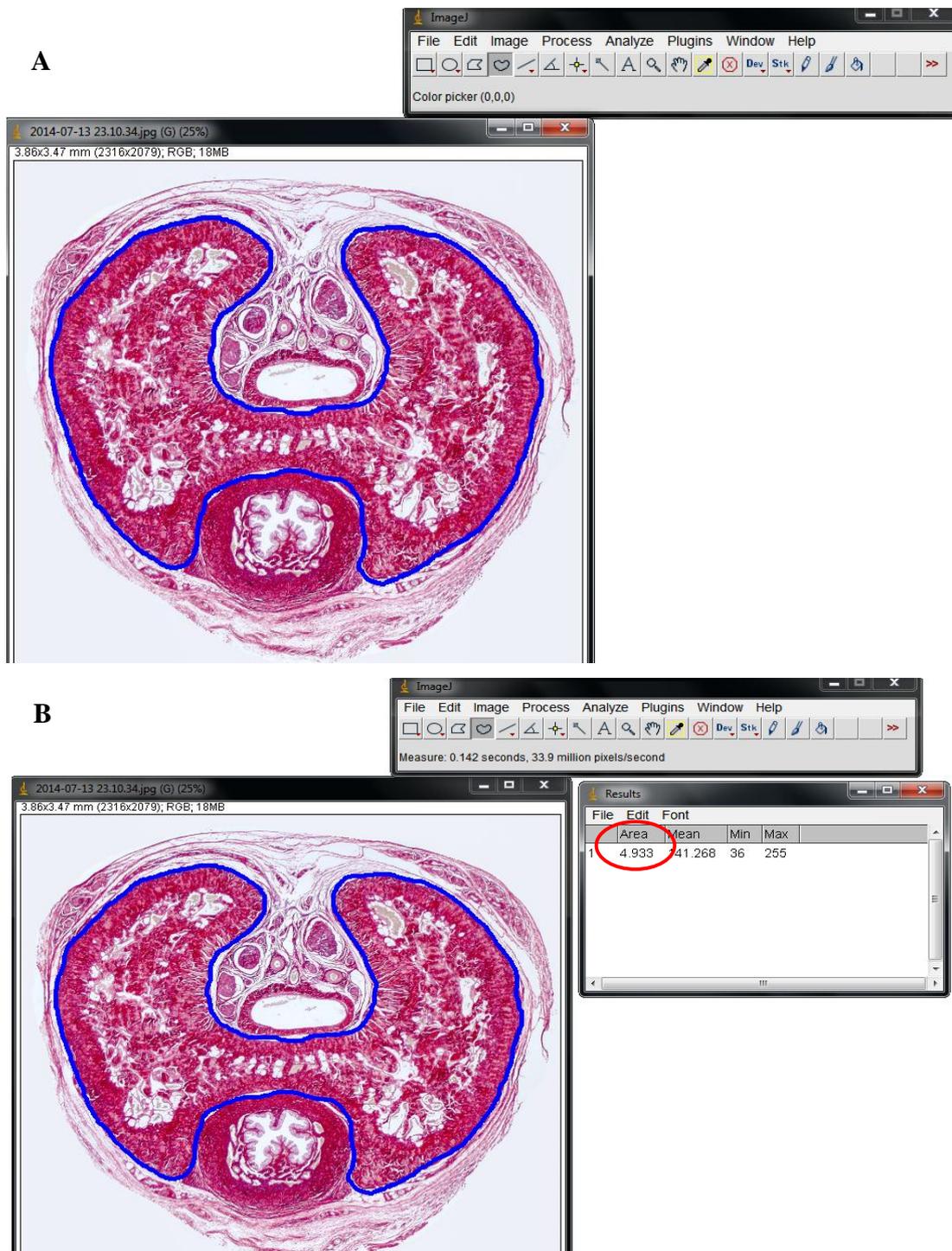
Figura 11 – Mensurando a área do corte transversal do terço médio do pênis



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

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

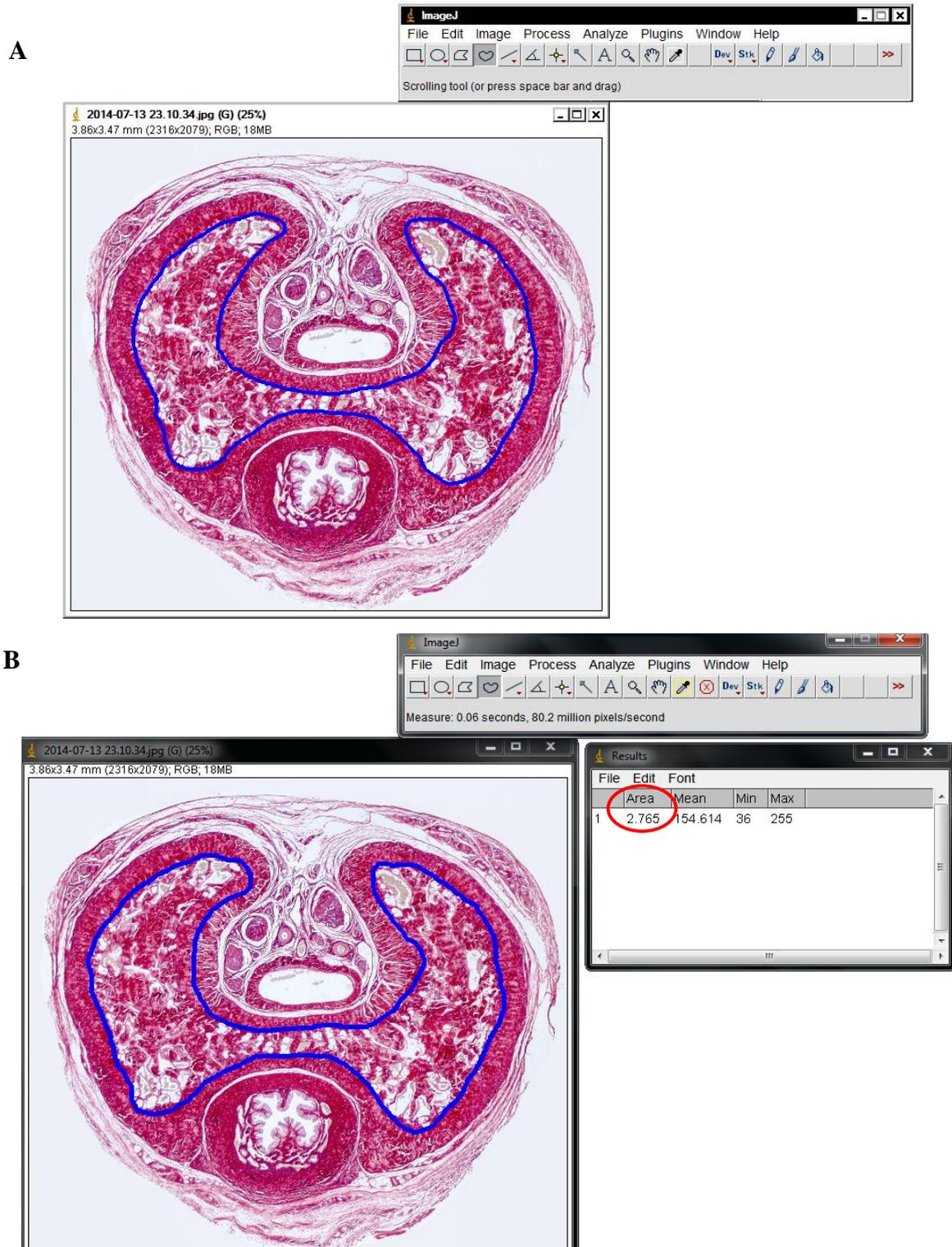
Figura 12 – Mensurando a área do corte transversal do terço médio do corpo cavernoso com a túnica albugínea



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

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

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



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

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

2.4.2 Densidades de superfície (Sv)

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

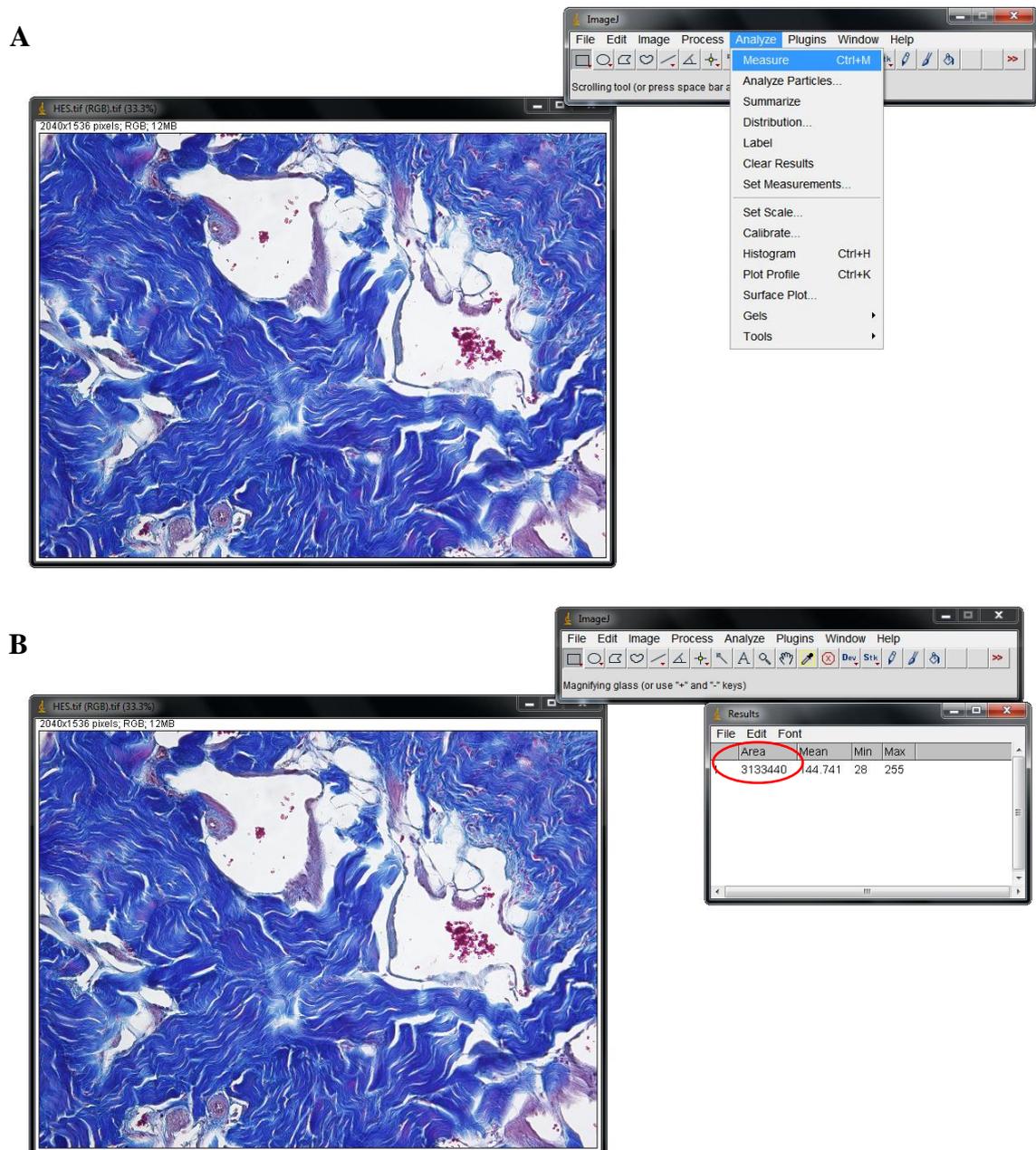
2.4.2.1 Método de contagem de pontos

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

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

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

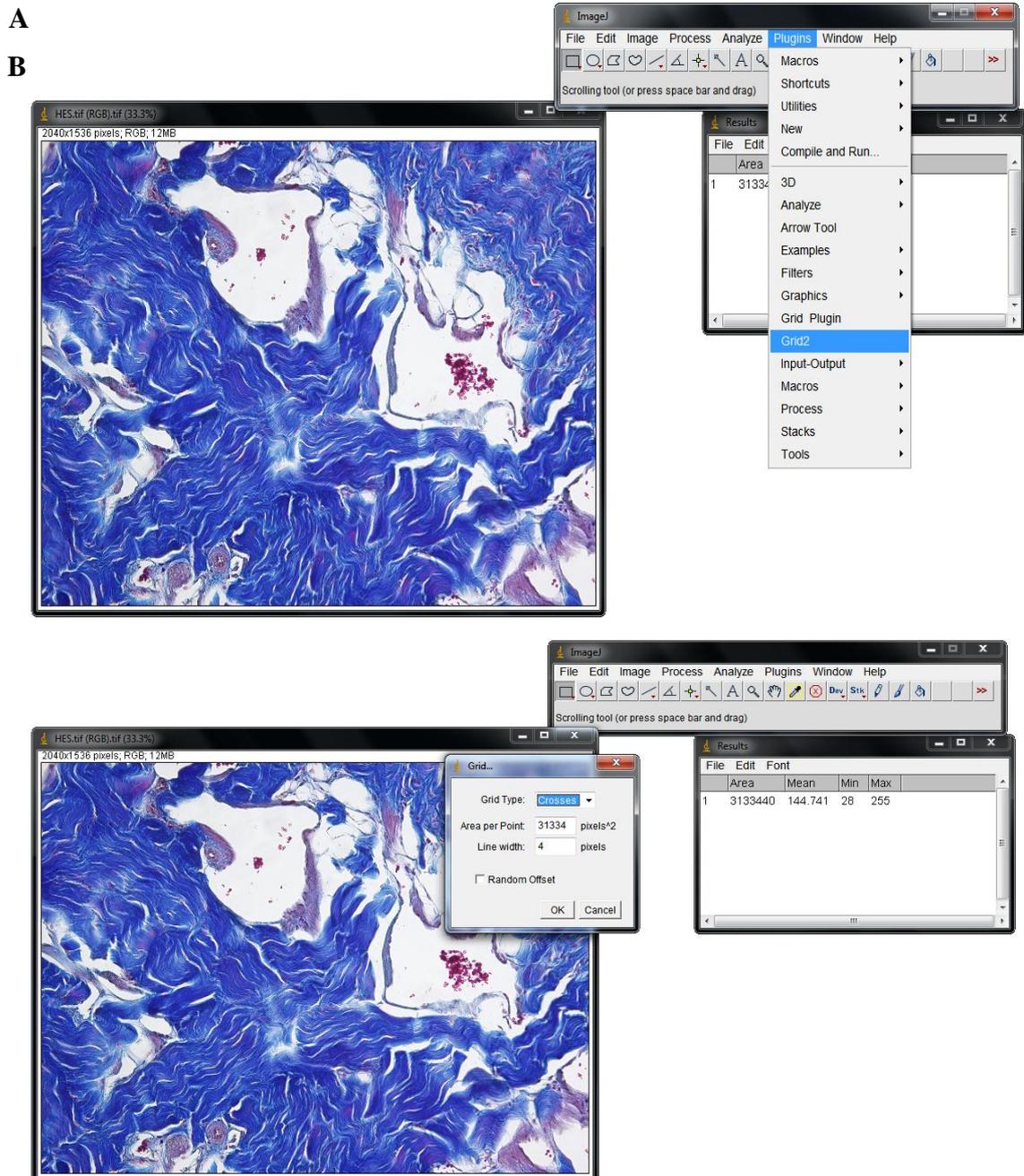
Figura 14 – Passos para a obtenção do resultado da área da imagem para realização do método de contagem de pontos no software Image J



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

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

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

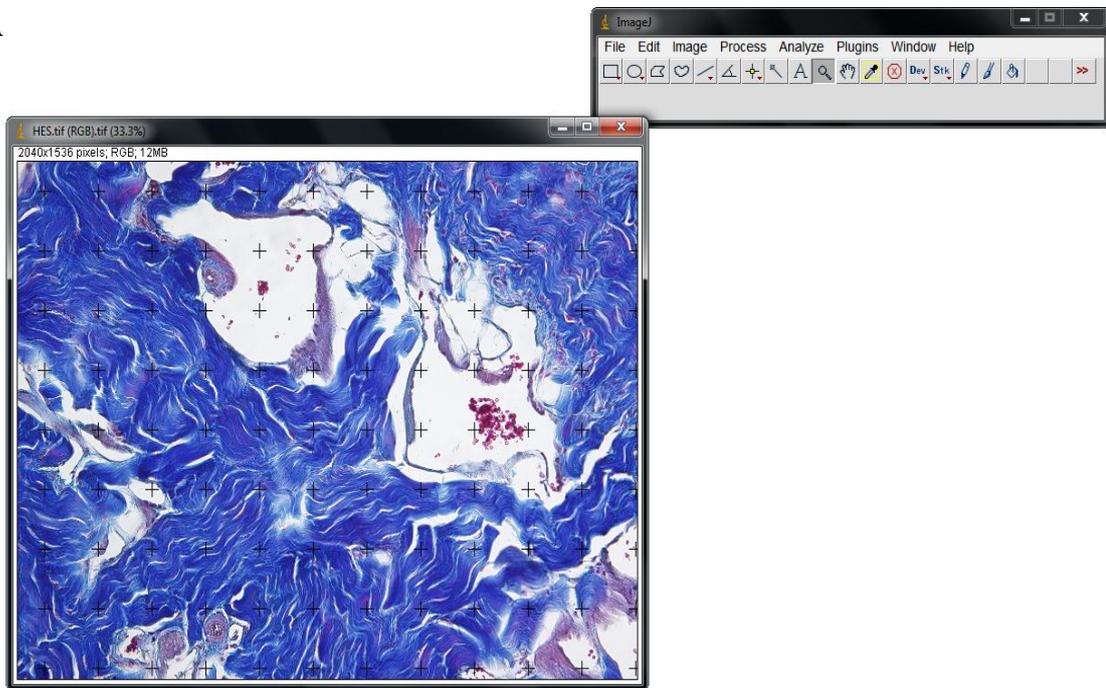


Legenda: Em A, a imagem mostra a seleção da ferramenta *plugins, grid2*. Em B, a utilização da área previamente mensurada dividida pelo número de ponto a ser colocado na grade e a seleção do tipo de grade, *crosses*.

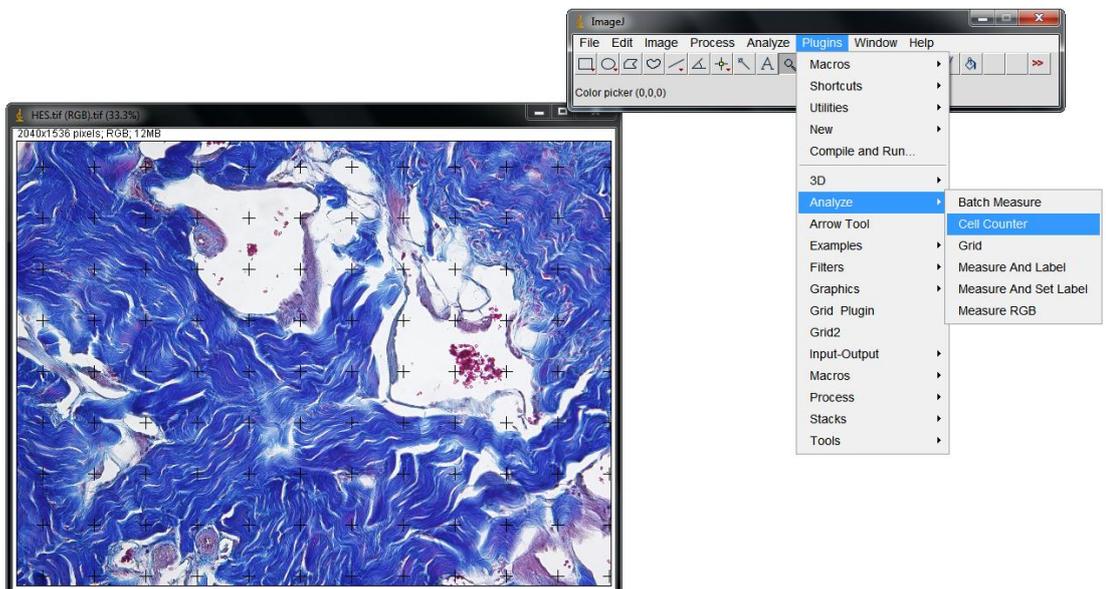
Nota: Imagem do corte transversal do pênis do rato hipertenso tratado com sildenafil, grupo HES, objetiva de 20x, aberta no software Image J.

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

A



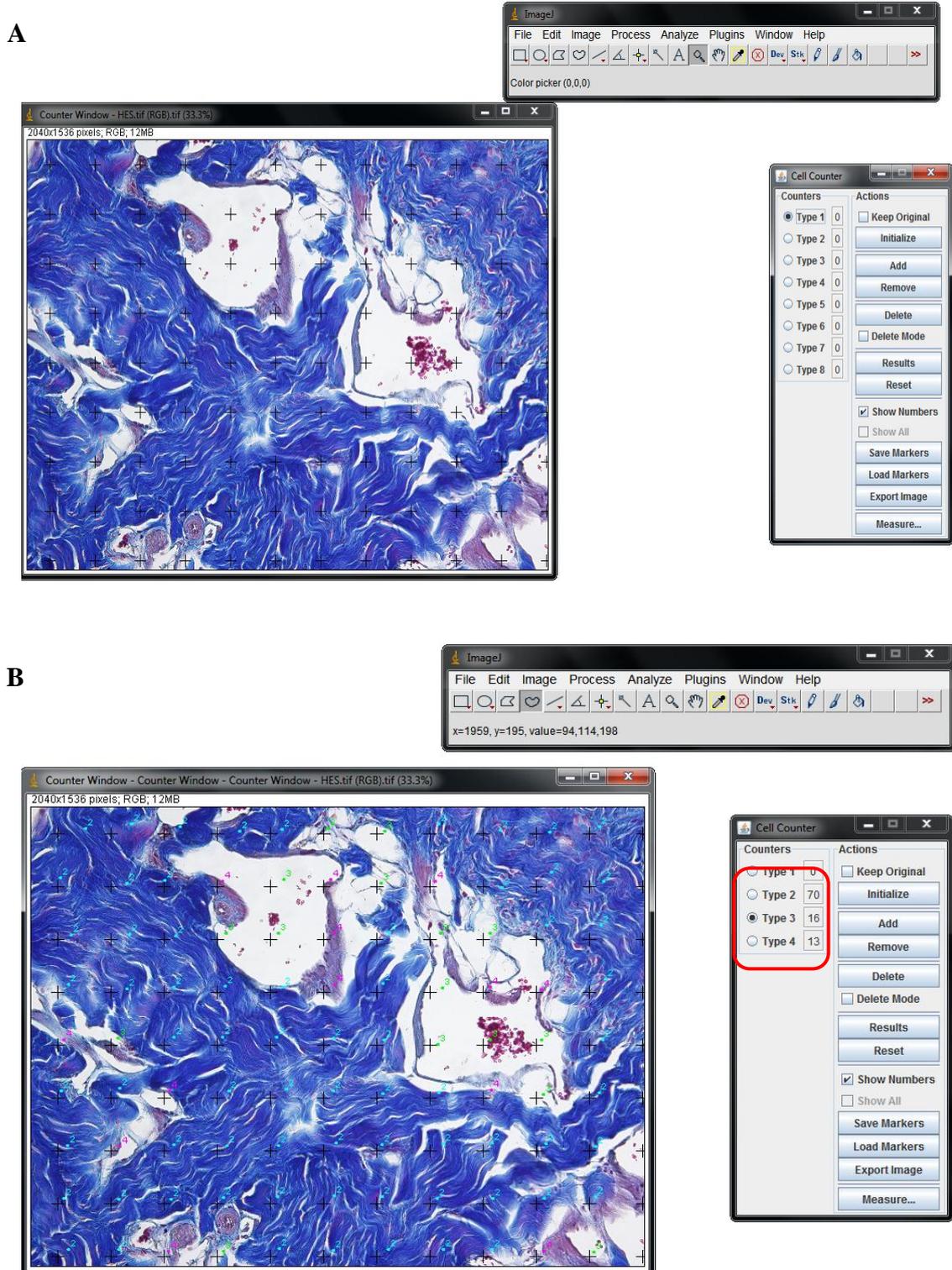
B



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

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

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



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

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

2.4.3 Densidade de proliferação celular

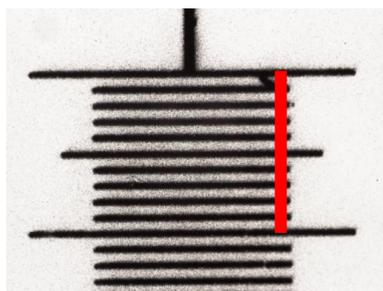
A densidade de proliferação celular nos corpos cavernosos foi quantificada pelo número de células em proliferação por mm^2 . Para tal quantificação, fotomicrografias dos cortes imunomarcados com anticorpo anti-PCNA, foram capturadas com magnificação de 600x, e analisadas no *software Image J*.

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

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

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

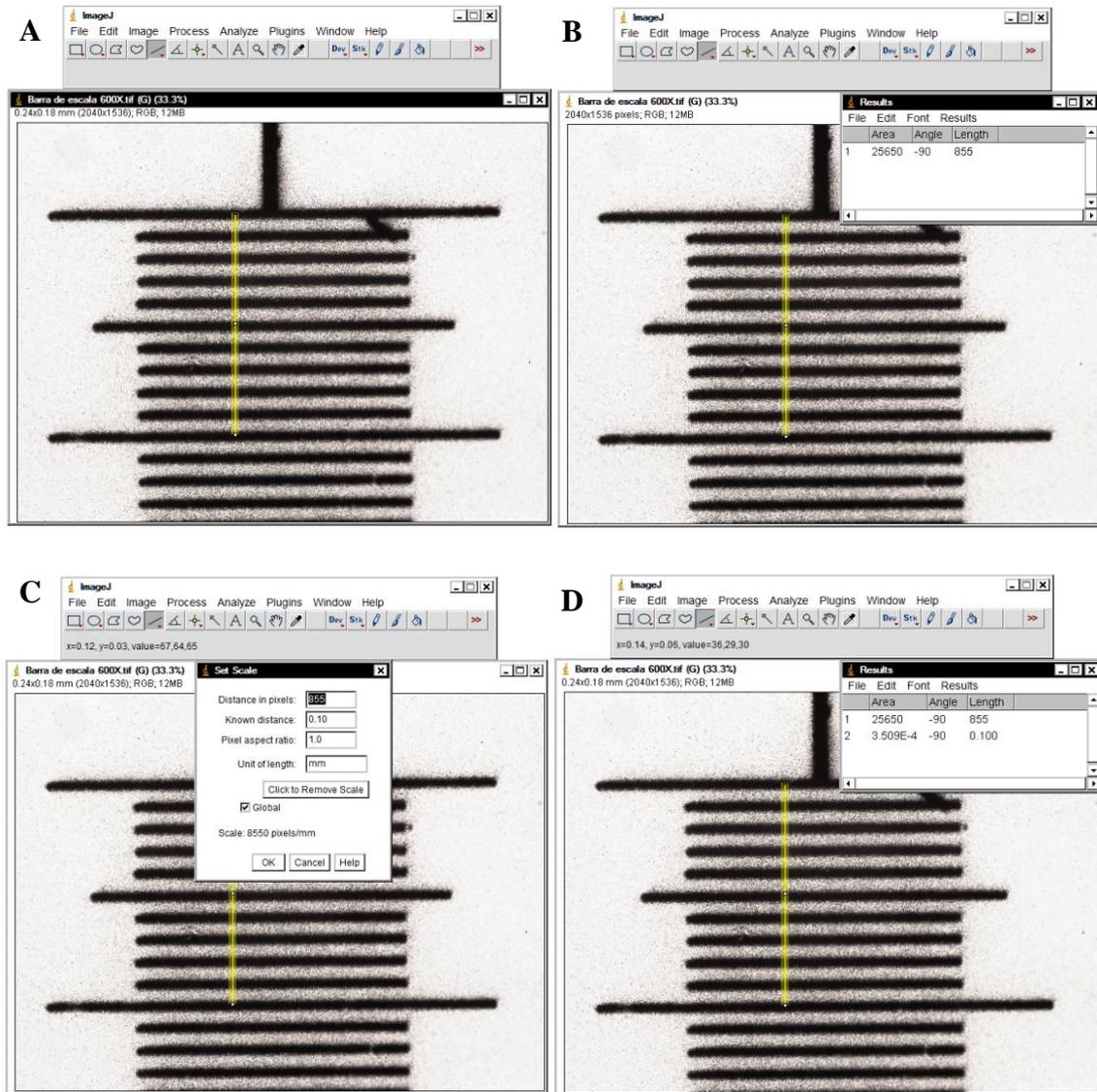
Figura 18 – Fotomicrografia da régua milimetrada utilizada para calibrar o software image J, objetiva de 60x



Legenda: A linha em vermelho marca a distância de 0.1 milímetro.

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

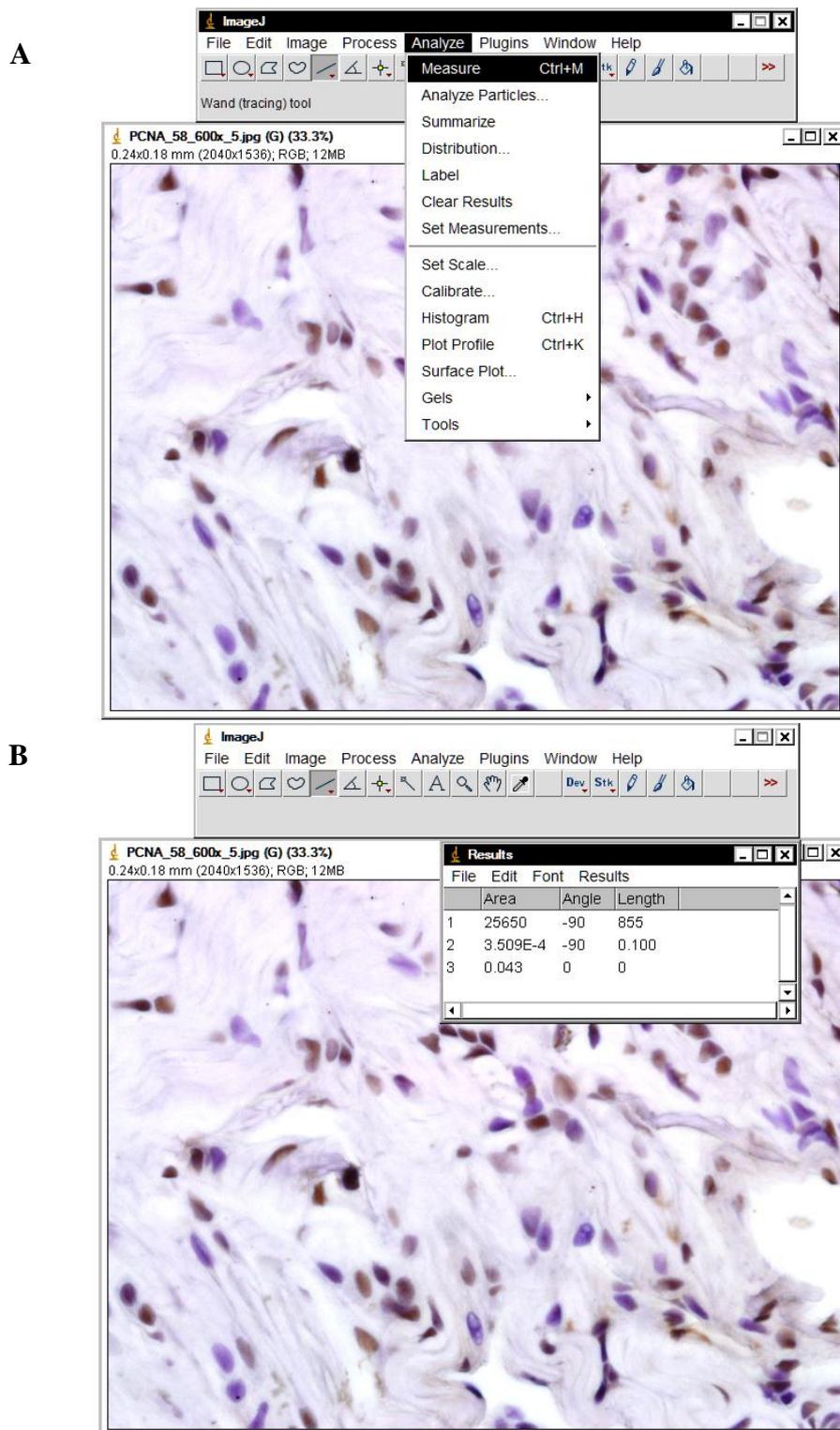
Figura 19 – Utilização da régua milimetrada, objetiva de 60x, para calibrar o software *Image J*



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

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

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

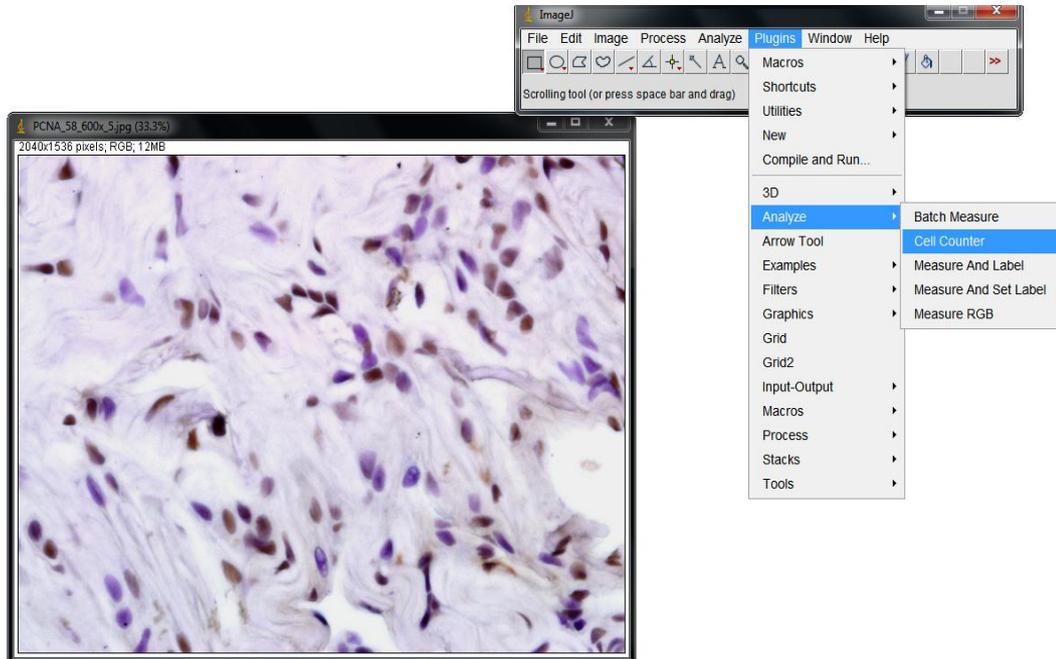


Legenda: Em A, mostramos o processo de mensuração da área da imagem. Em B, mostramos o resultado das três mensurações realizadas: a primeira, a distancia em pixels; a segunda, a distância em mm; e a terceira, a da área da imagem em mm².

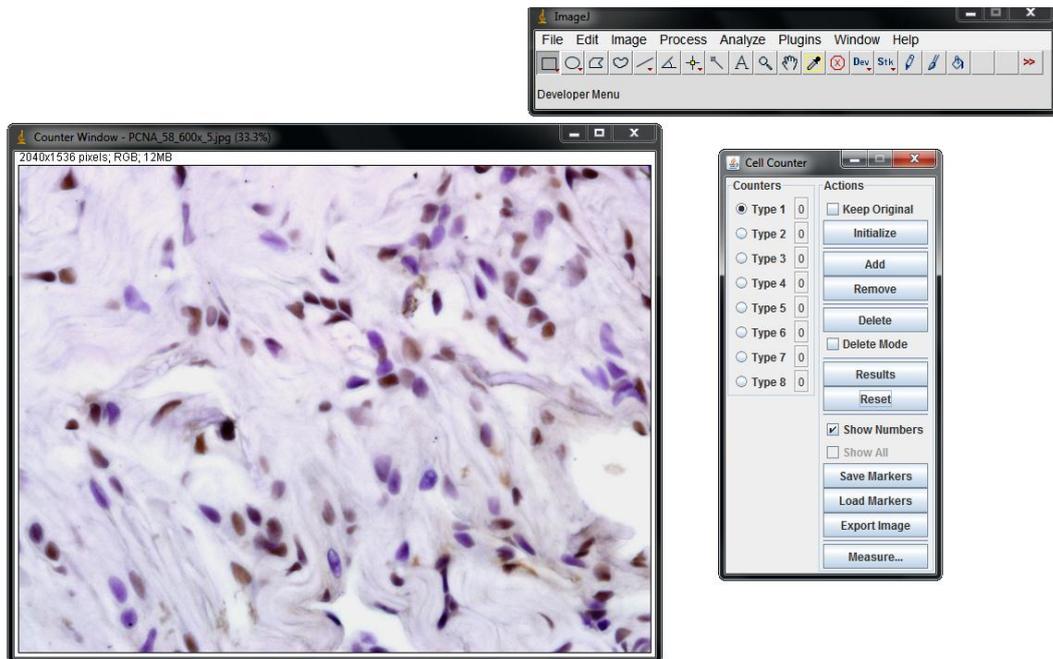
Nota: Imagem do corte transversal do pênis do rato hipertenso, grupo H, imunomarcado com anti-PCNA, objetiva de 60x, aberta no sotware Image J.

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

A



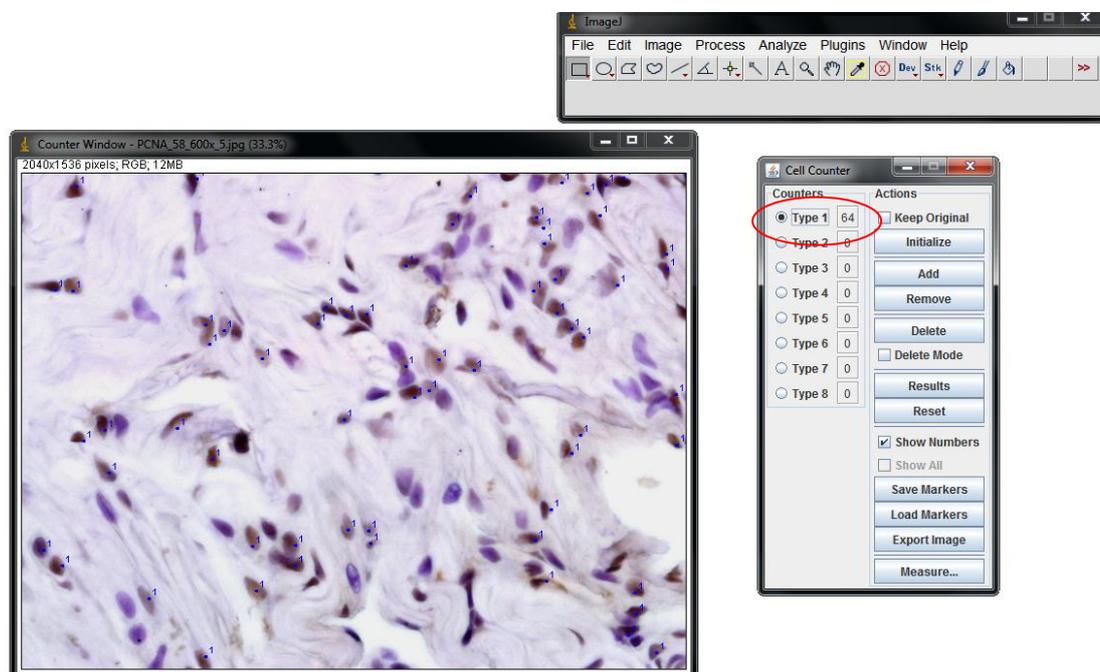
B



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

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

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



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

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

2.5 Análise estatística

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

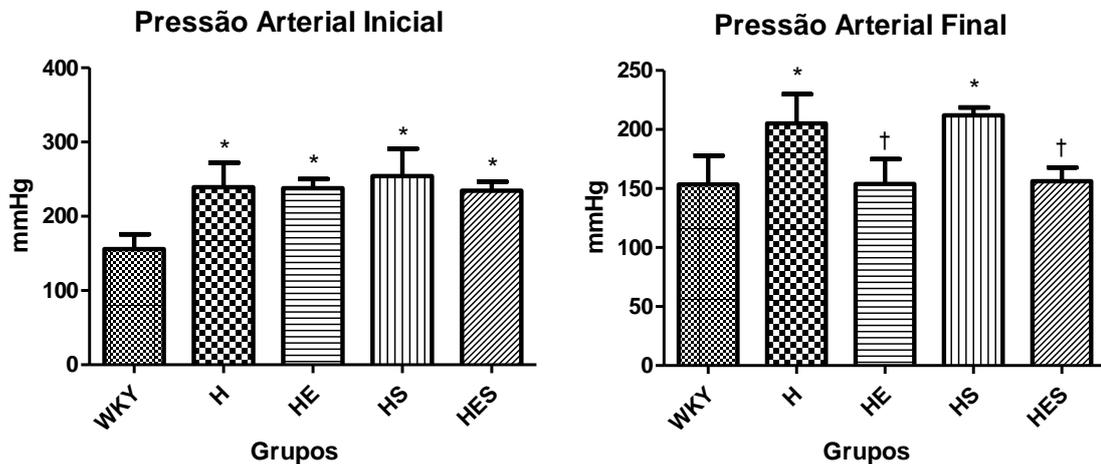
3 RESULTADOS

3.1 Pressão arterial

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

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

Figura 23 – Gráficos da pressão arterial inicial e final



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

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

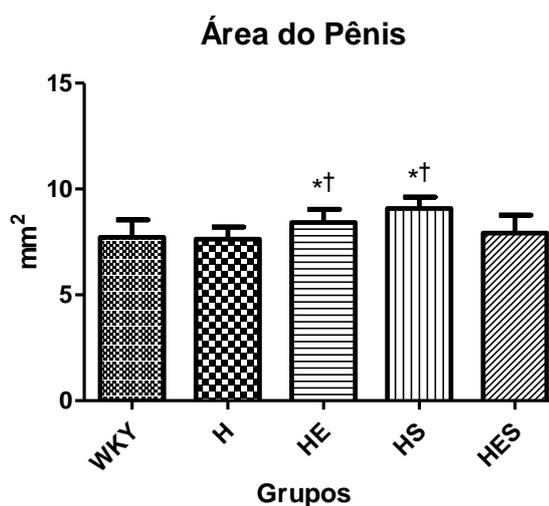
	WKY	H	HE	HS	HES	Valor de p
Pressão sanguínea inicial (mmHg)	155,7 ± 20,0	239,2 ± 33,1*	237,7 ± 12,5*	254,1 ± 37,0*	234,4 ± 12,0*	<0,0001
Pressão sanguínea final (mmHg)	153,4 ± 24,4	205,1 ± 24,8*	153,9 ± 21,0 [†]	212,1 ± 6,5*	156,2 ± 11,5 [†]	<0,0001

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

3.2 Área do corte transversal do pênis

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

Figura 24 – Gráfico da área do corte transversal do pênis (mm²)



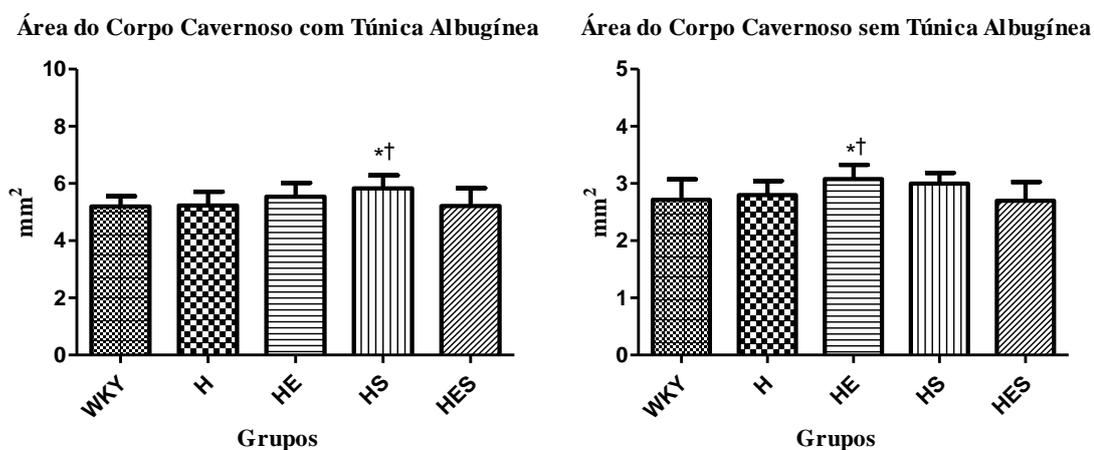
Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; * - representa diferença estatística de WKY; † - representa diferença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

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

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

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

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

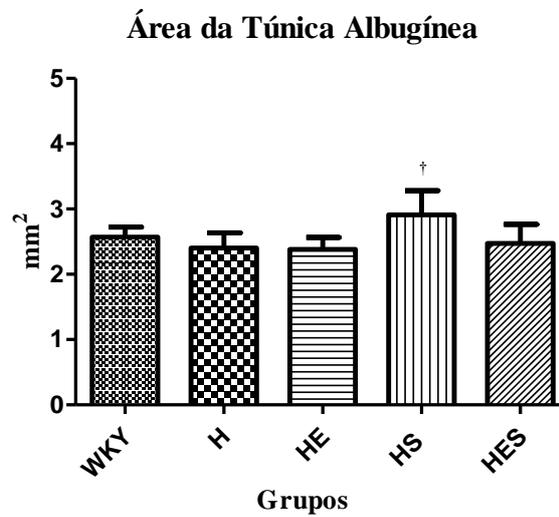


Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; * - representa diferença estatística de WKY; † - representa diferença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

3.4 Área do corte transversal da túnica albugínea

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

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

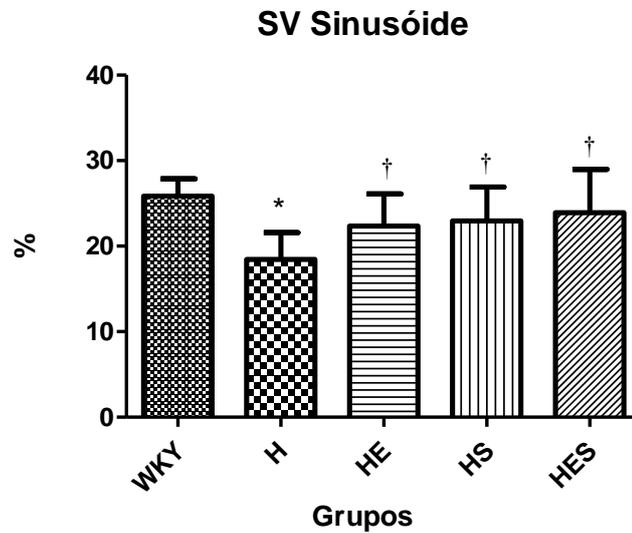


Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; † - representa diferença estatística de H.

3.5 Densidades de espaço sinusoidal no corpo cavernoso

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

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

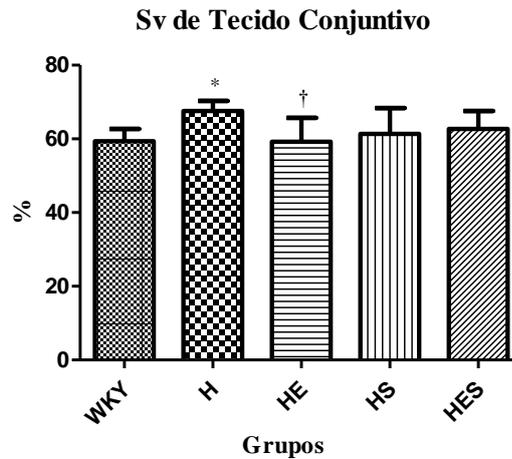


Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; * - representa diferença estatística de WKY; † - representa diferença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

3.6 Densidades de tecido conjuntivo no corpo cavernoso

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

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

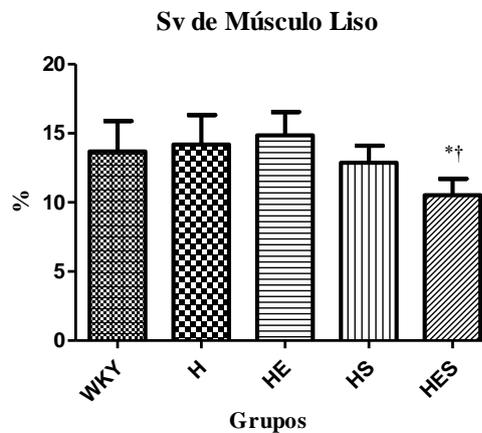


Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; * - representa diferença estatística de WKY; † - representa diferença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

3.7 Densidade de músculo liso do corpo cavernoso

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

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

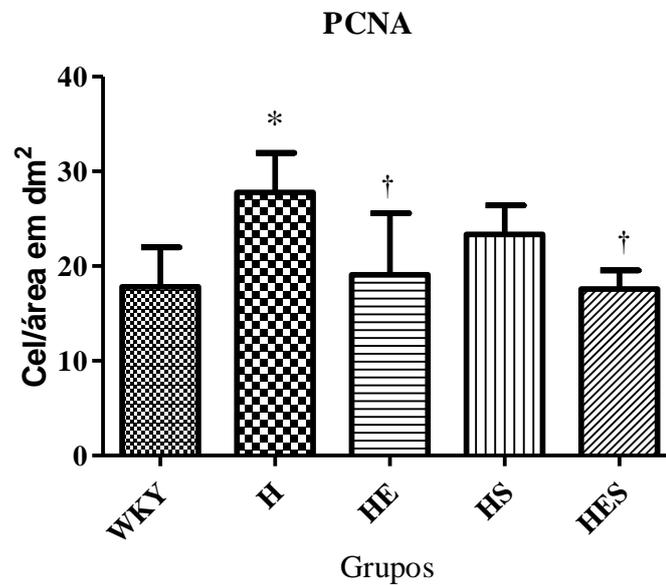


Legenda: WKY - ratos normotensos; H - ratos hipertensos não tratados; HE ratos hipertensos tratados com enalapril; HS - ratos hipertensos tratados com sildenafil; HES - ratos hipertensos tratados com a combinação de enalapril e sildenafil; * - representa diferença estatística de WKY; † - representa diferença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

3.8 Densidade de células em proliferação por área

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

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



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

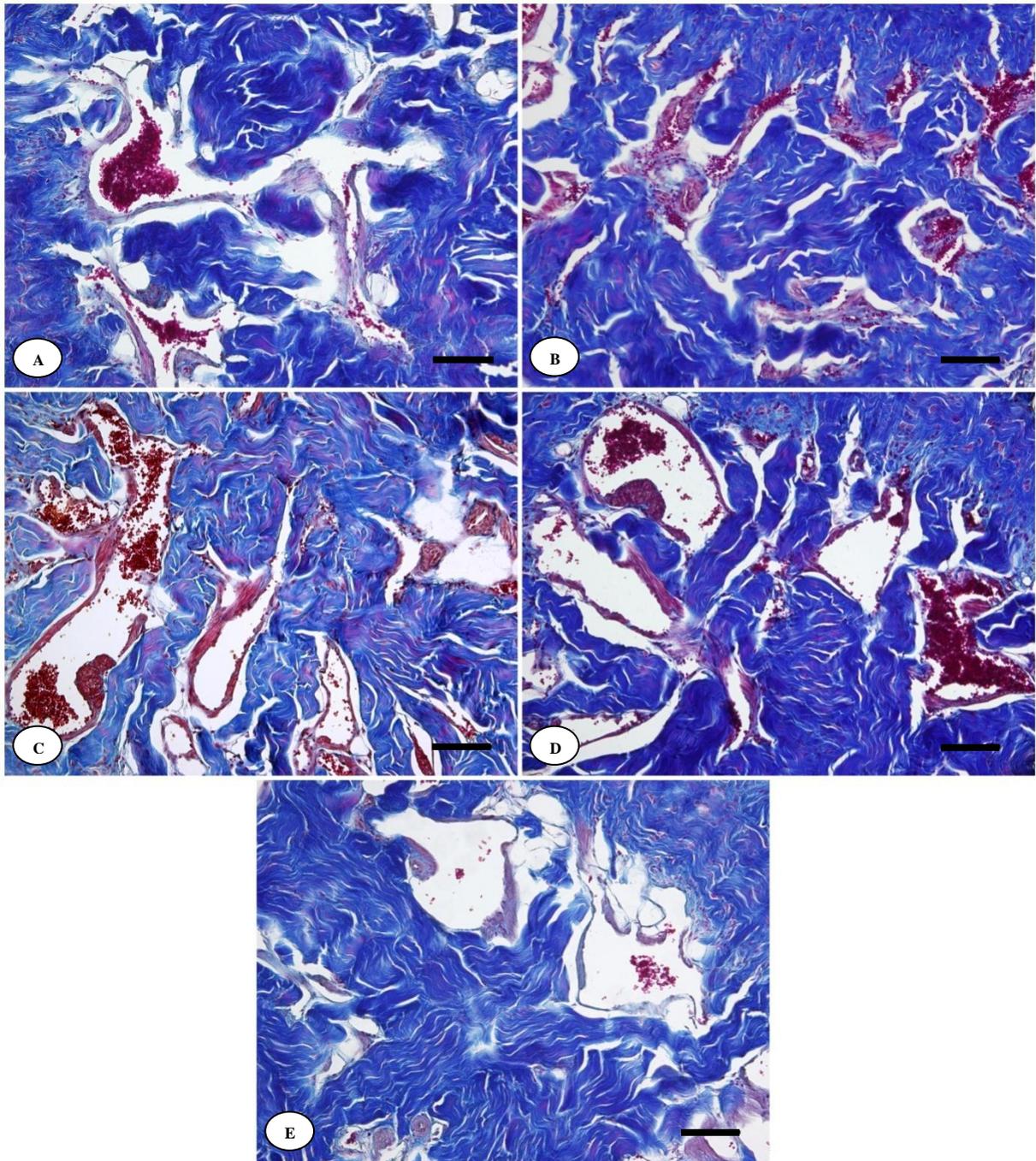
Tabela 2: Dados morfométricos penianos dos ratos normotensos (WKY), ratos hipertensos não tratados (H) e ratos hipertensos tratados com enalapril (HE), sildenafil (HS), ou da combinação de enalapril e sildenafil (HES)

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

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

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

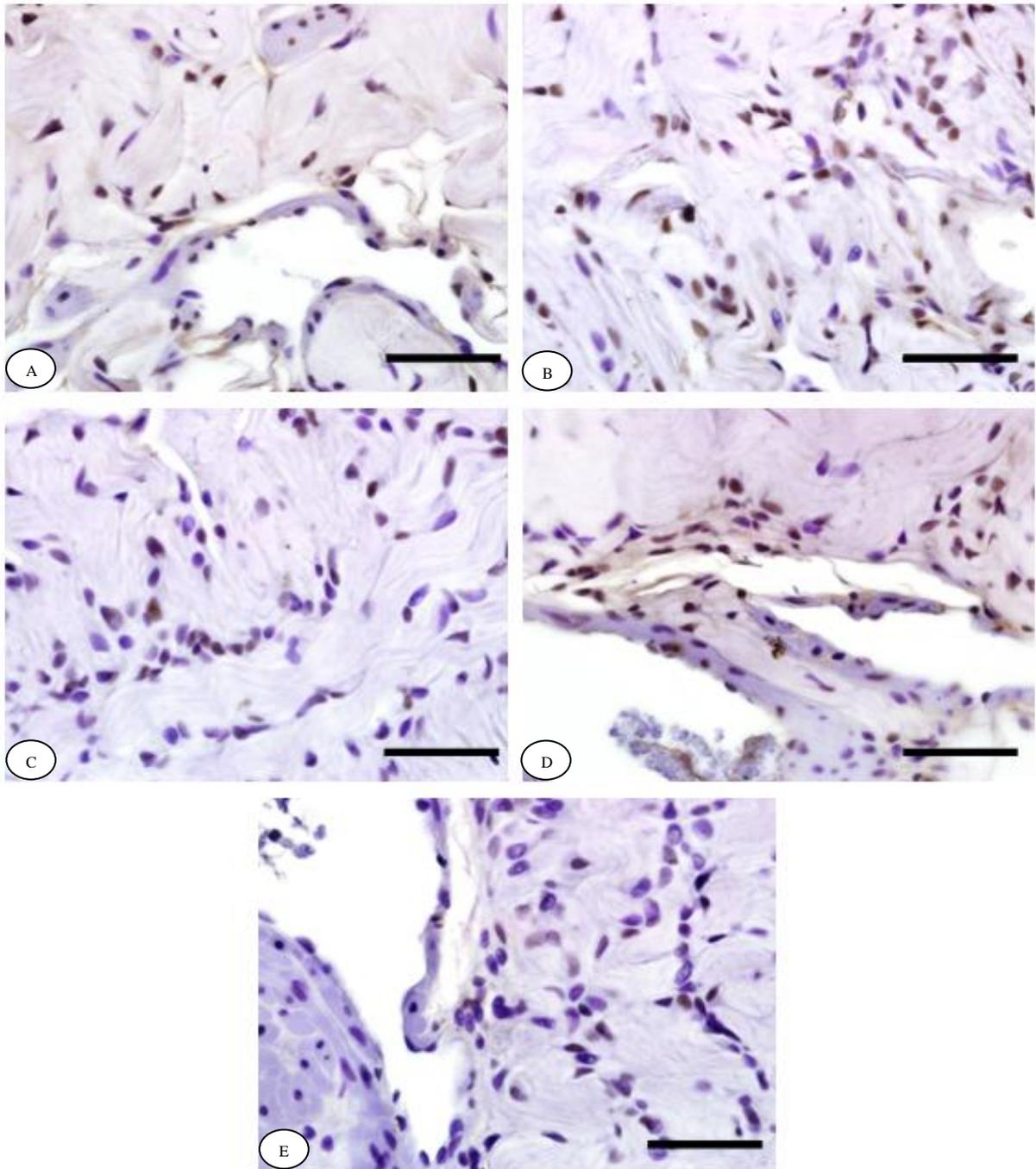
Figura 31 - Imagem comparando as estruturas dos corpos cavernosos do pênis de ratos nos diferentes grupos



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

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

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



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

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

4 DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSÃO

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

REFERENCIAS

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

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

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

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

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

Diogo Benchimol de Souza

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

08-Sep-2014

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

Dear Dr. De Souza:

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

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

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

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

I look forward to hearing from you very shortly.

With kind regards,

Donna Schena
Assistant Managing Editor,
Journal of Sexual Medicine



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

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

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

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

Running title: Penile of hypertensive rats treated or not

Word count: 3,260

Number of references: 39

For Peer Review

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

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

Bruno Felix-Patricio, MSc. ^{ab} Diogo B De Souza, PhD. ^a Waldemar S Costa, PhD. ^a

Francisco J Sampaio PhD. ^a

^a Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro,

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

^b Institute for Humanities and Health, Federal Fluminense University, Rua

Recife, s/n, Jardim Bela Vista, Rio das Ostras – RJ, Brazil.

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

CORRESPONDING AUTHOR:

Diogo B. de Souza

Urogenital Research Unit – UERJ

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

CEP: 20551-030

Phone: +55 21 2868-8399

E-mail: diogobenchimol@gmail.com

ABSTRACT

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

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

ORIGINAL ARTICLE

Correspondence:

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

Keywords:

arginine, erectile dysfunction, glutamine, penis, radiotherapy

Received: 23-Jan-2013

Revised: 2-Aug-2013

Accepted: 26-Aug-2013

doi: 10.1111/andr.134

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

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

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

SUMMARY

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

J Androl 2012;33:684–690

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

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

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

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

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

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

DOI: 10.2164/jandrol.111.014159

Research Article

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

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

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

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

Received 4 May 2011; Accepted 28 August 2011

Academic Editor: Maxwell V. Meng

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

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

1. Introduction

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

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

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

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

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



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



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

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

Rio de Janeiro, 03 de Outubro de 2012.

Mato

Patricia Cristina Lisboa

Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

1.ª Prof.ª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva

Prof.ª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas UERJ / 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br
Matricula 34765-8