



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

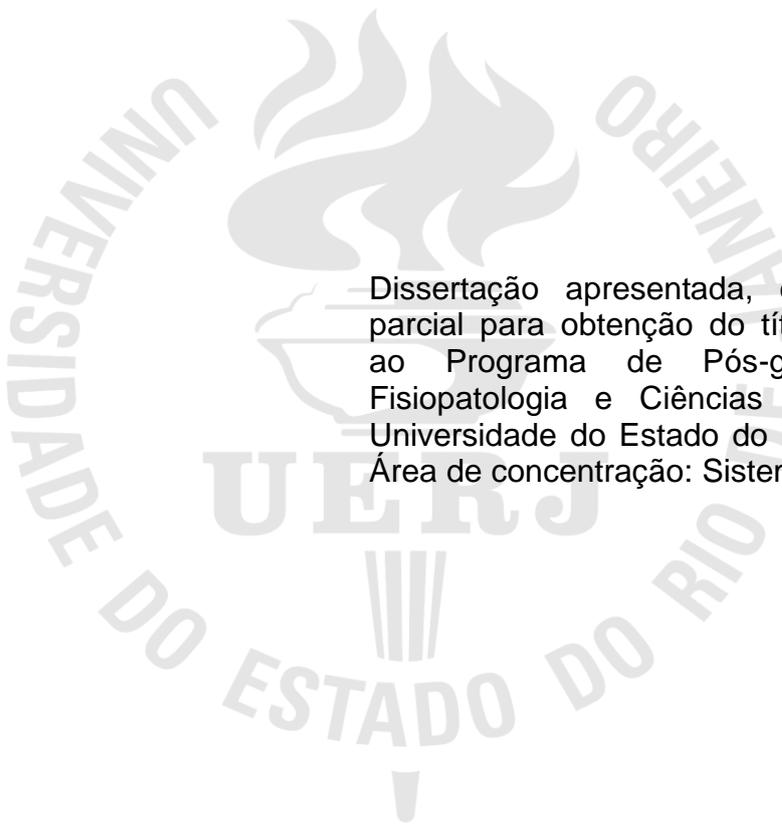
Vivian Alves Pereira

**Avaliação dos efeitos da hiperglicemia sobre a estrutura vascular  
peniana em coelhos Nova Zelândia**

Rio de Janeiro  
2012

Vívian Alves Pereira

**Avaliação dos efeitos da hiperglicemia sobre a estrutura vascular peniana em coelhos Nova Zelândia**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, 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. Waldemar Silva Costa

Coorientador: Prof. Dr. Maurício Alves Chagas

Rio de Janeiro

2012

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

P436 Pereira, Vivian Alves.  
Avaliação dos efeitos da hiperglicemia sobre a estrutura vascular peniana em coelhos Nova Zelândia / Vivian Alves Pereira.  
63 f. : il.

Orientador: Waldemar Silva Costa.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1.Diabetes – Complicações e sequelas – Teses. 2. Hiperglicemia – Complicações. 3. Disfunção erétil – Teses. 4. Pênis - Ereção - Teses. 5. Coelho como animal de laboratório - Teses. I. Costa, Waldemar Silva. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.379-008.64:616.69-008.1

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

---

Assinatura

---

Data

Vivian Alves Pereira

**Avaliação dos efeitos da hiperglicemia sobre a estrutura vascular peniana em coelhos Nova Zelândia**

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

Aprovada em 30 de maio de 2012.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luiza Bastos  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Márcio Antônio Babinski  
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2012

## DEDICATÓRIA

Dedico e consagro este trabalho a Deus, sem o qual nada teria sido feito.  
A Deus toda honra, glória e majestade para sempre. Amém.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me concedido a oportunidade de viver até este momento, sem o qual nada seria feito.

Agradeço ao meu namorado Leonardo pelo amor, paciência, compreensão e por estar ao meu lado sempre.

Agradeço à minha família pelo amor e pelo apoio emocional em todos os momentos.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, na pessoa de meu estimado orientador Professor Doutor Waldemar Silva Costa, pela oportunidade e por todos os ensinamentos e contribuições para este trabalho.

Também a meus co-orientadores Professor Doutor Maurício Alves Chagas, Professor Doutor Marcelo Abidu-Figueiredo e Professor Doutor Marco Aurélio Pereira Sampaio pelo apoio intelectual, técnico e emocional, pelas idéias brilhantes e pela oportunidade de trabalhar em conjunto.

Agradeço aos colegas, alunos e técnicos do Laboratório de Biomorfologia Celular e Extracelular, pelo apoio técnico, pela amizade e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Ciências Cirúrgicas pelo espaço cedido e pela ajuda na condução do experimento bem como aos alunos da Unidade de Pesquisa Urogenital pela parceria durante a execução do projeto.

## RESUMO

PEREIRA, Vivian Alves. *Avaliação dos efeitos da hiperglicemia sobre a estrutura vascular peniana em coelhos Nova Zelândia*. 2012. 63f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Pacientes com diabetes mellitus (DM) têm elevadas taxas de disfunção erétil (ED). Diversos estudos examinaram esta associação. A associação entre o processo de hipertrofia vascular diabética e o grau de comprometimento dos seios cavernosos é pouco estudada. A proposta do presente estudo foi avaliar a estrutura vascular do tecido erétil de coelhos diabéticos e coelhos normais, através de histomorfometria computadorizada da artéria dorsal do pênis e dos seios vasculares cavernosos em ambos os grupos. Foram utilizados 20 coelhos adultos machos da raça Nova Zelândia, divididos em dois grupos com 10 animais cada, o grupo diabético (GD) e o grupo controle (GC). Os animais foram previamente anestesiados e os coelhos do grupo GD receberam aloxano na dose de 100mg/kg, via endovenosa para indução da diabetes. Após 10 semanas, os animais foram mortos e os pênis retirados. Fragmentos do pênis foram fixados em formalina tamponada durante 24-48 horas e processados para parafina. Para análise imunohistoquímica e identificação das fibras musculares lisas, foi utilizado o anticorpo anti alfa-actina. Foram feitas análises da espessura média das túnicas íntima e média da parede da artéria dorsal do pênis (ADP), densidade nuclear na túnica média e avaliação por microscopia de polarização do conteúdo colágeno na túnica adventícia. Na túnica íntima foram observadas vacuolizações no endotélio. Os valores encontrados para espessura de GC e GD foram respectivamente (em  $\mu\text{m}$ ):  $35,012 \pm 3,177$  e  $44,330 \pm 8,434$  ( $P=0,0350$ ). Foi encontrada diferença na área média da parede da ADP ( $P=0,0179$ ). Para densidade nuclear GC  $0,007154 \pm 0,001954$  núcleos/ $\mu\text{m}^2$  e GD  $0,004808 \pm 0,002069$  núcleos/ $\mu\text{m}^2$  ( $P=0,0855$ ). Foram observadas mudanças na birrefringência das fibras colágenas na túnica adventícia, passando de alaranjado no grupo GC para esverdeado no grupo GD, indicando a mudança em sua espessura. A área ocupada pelos seios cavernosos apresentou diminuição significativa de 37 % no grupo diabético ( $P=0,0013$ ). Este conjunto de alterações sugere que a hiperglicemia crônica provocada pelo diabetes levou a um processo de hipertrofia da musculatura lisa na parede vascular e nas trabéculas do corpo cavernoso, com diminuição da área dos seios, o que possivelmente altera as propriedades hemodinâmicas do órgão.

Palavras-chave: Diabetes. Hipertrofia vascular. Histomorfometria. Pênis. Coelho.

## ABSTRACT

Patients with diabetes mellitus (DM) have a high incidence of erectile dysfunction (ED). Several epidemiological studies have assessed the correlation between DM and ED. Evaluation of animal models demonstrated that neural and vascular changes seen with DM may be associated with ED. Vascular diseases such as microangiopathy, atherosclerosis, and hypertension are often observed in patients with DM. The aim of this study was to assess the morphological changes of penile vascular structures and the corpus cavernosum area in alloxan-induced diabetic rabbits. Twenty male rabbits (2 months old) were divided into two groups with 10 rabbits each, the control group (CG) and the diabetic group (DG). The animals from the DG received an intravenous injection of alloxan (100mg/kg) to induce DM. Ten weeks after the induction of DM, all animals were euthanized. Two fragments of the penile shaft were harvested and samples were processed and paraffin embedded. Sections (5 $\mu$ m) were cut and stained for histological and immunohistochemical markers. Nuclear protrusion toward the lumen, and cytoplasmic vacuolization were observed in the tunica intima of the dorsal artery of the penis in DG. The thicknesses of the tunica media increased significantly from 35.01 $\pm$ 3,17  $\mu$ m in CG to 44.33 $\pm$ 8,43  $\mu$ m in DG ( $p=0,0350$ ). Was also observed a significant increase in the area of the tunica media ( $p=0,0179$ ). There was no significant change in smooth muscle cell density in the tunica media of the dorsal artery of the penis ( $p=0,0855$ ). The collagen fiber pattern of the tunica adventitia of the dorsal artery of the penis was different between the control and diabetic groups. There was a decrease of 37% in the area occupied by the cavernous sinuses in DG, and the difference between CG and DG was significant ( $p = 0.0013$ ). Alloxan-induced DM in rabbits promotes important changes in penile vascular structures, thereby decreasing blood supply and affecting penile hemodynamics, leading to erectile dysfunction.

Keywords: Diabetes mellitus. Histomorphometry. Rabbit. Penis. Artery.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotomicrografia de corte transversal do corpo do pênis de coelho. CC= Corpo Cavernoso, TA= Túnica Albugínea, U= Uretra, CE= Corpo Esponjoso ADP= Artéria dorsal do pênis. Tricrômio de Masson 40X..... 18
- Figura 2 – Fotomicrografia mostrando o pênis de Coelho Nova Zelândia (visão ventral). 1) Ramos da artéria dorsal do pênis, 2) Anastomose entre a artéria dorsal do pênis direita e a artéria dorsal do pênis esquerda, a) Glândula, b) corpo, c) glândulas prepuciais. Ozgel et al. (2003)..... 20
- Figura 3 – Representação esquemática mostrando a vascularização do pênis humano. CC= Corpo cavernoso. CE= Corpo esponjoso. (Gray, 1988)..... 20
- Figura 4 – Fotomicrografia da ADP. A) Ferramenta de medida de espessura das túnicas média e íntima artéria dorsal do pênis. B) Ferramenta de medida da área da parede da ADP. Imunomarcção com Anti-alfa-actina para músculo liso. x400..... 27
- Figura 5 – A) Fotomicrografia evidenciando o corpo cavernoso do pênis de coelho. Tricrômio de Masson. x40. Barra de escala: 300 µm. CC= Corpo cavernoso. B) Imagem digitalizada e binarizada, mostrando a área dos seios cavernosos em preto..... 27
- Figura 6 – Gráfico mostrando a curva glicêmica em jejum dos coelhos do grupo controle (quadrado) e do grupo de coelhos diabéticos (losango), desde o dia zero até a décima semana do experimento..... 29
- Figura 7 – Fotomicrografia da túnica íntima da ADP de coelho. A) Coelho do grupo controle. B) Coelho do grupo diabético, mostrando vacuolização citoplasmática e protrusão nuclear nas células endoteliais. PAS. x1000. Barra de escala 10µm..... 30

- Figura 8 – Fotomicrografias da artéria dorsal do pênis, mostrando a imunomarcagem para músculo liso na túnica média. Anticorpo anti-alfa-actina de músculo liso. x400. Barra de escala 50µm. A) Grupo controle. B) Grupo diabético..... 32
- Figura 9 – Fotomicrografias da artéria dorsal do pênis, mostrando a organização do colágeno na túnica adventícia, com predominância de fibras colágenas de cor vermelho alaranjada no grupo controle (A) e de cor verde do grupo diabético (B). Picro Sirius Red sob luz polarizada. x400. Barra de escala 50µm..... 33
- Figura10– Área dos seios cavernosos do pênis de coelho. Imagem binarizada. x40. Barra de escala 200µm. A) Coelho do grupo controle. B) Coelho do grupo diabético..... 35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP –	Artéria dorsal do pênis
AGE –	Advanced Glicosylation End
CC –	Corpo cavernoso
DE –	Disfunção erétil
DM –	Diabetes Mellitus
GNE –	Glicosilação não enzimática
PAS –	Periodic acid – Schiff
PBS –	Phosphate buffered saline
PDGF –	Platelet-derived growth factor
SD –	Standard deviation
TGF- $\beta$ –	Tirosin Growth Factor

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
1.1	<b>Diabetes Mellitus</b> .....	14
1.2	<b>Hiperglicemia e dano vascular</b> .....	15
1.3	<b>Modelo animal</b> .....	16
1.3.1	<u>Morfologia do pênis do coelho</u> .....	17
1.3.2	<u>Vascularização Peniana</u> .....	19
2	<b>OBJETIVO</b> .....	21
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1	<b>Comitê de ética</b> .....	22
3.2	<b>Seleção e preparação dos animais</b> .....	22
3.3	<b>Processamento histológico</b> .....	23
3.4	<b>Colorações histológicas e histoquímicas</b> .....	23
3.4.1	<u>Tricrômio de Masson</u> .....	24
3.4.2	<u>Picrosirius Red</u> .....	24
3.4.3	<u>Acido Periódico / Reativo de Schiff</u> .....	24
3.5	<b>Imunohistoquímica</b> .....	25
3.6	<b>Histomorfometria Computadorizada</b> .....	26
3.7	<b>Análise estatística</b> .....	28
4	<b>RESULTADOS</b> .....	29
4.1	<b>Glicose sérica</b> .....	29
4.2	<b>Alterações morfológicas na ADP</b> .....	30
4.2.1	<u>Túnica íntima</u> .....	30
4.2.2	<u>Túnica média</u> .....	31
4.2.3	<u>Túnica adventícia</u> .....	33
4.3	<b>Análise morfométrica dos seios cavernosos</b> .....	34
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	36
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	39
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40
	<b>APÊNDICE</b> – Artigo submetido: Sinusoidal Constriction and Vascular Hypertrophy in the Diabetes-Induced Rabbit Penis.....	46

<b>ANEXO</b>	–	Declaração	do	Comitê	de	Ética	em	
Pesquisa.....								61

## INTRODUÇÃO

A ereção peniana resulta do aumento da pressão arterial, relaxamento do músculo liso arterial e cavernoso e redução do retorno venoso (Lue et al., 1983). A diminuição no relaxamento das fibras musculares lisas do corpo cavernoso ou alteração em sua densidade pode representar a base estrutural para a disfunção erétil (DE) (Lue e Tanagho, 1987; Krane et al., 1989; Sattar et al., 1996; Chitale, 2009).

Diversos estudos utilizando diferentes modelos animais mostraram as alterações morfológicas e fisiológicas que podem ocorrer no processo de ereção (Qiu et al., 2000; Burnett, 2001; Bischoff, 2001; Yesilli et al., 2001).

As células musculares lisas, as fibras do sistema elástico e o colágeno, são importantes constituintes penianos (Hsu et al., 1994; Bastos et al., 2004) envolvidos no processo de ereção, além de permitir adequada resistência durante o retorno para o estado não erétil (Sattar et al., 1994).

Pacientes com diabetes mellitus (DM) apresentam elevadas taxas de disfunção erétil. Diversos estudos epidemiológicos examinaram esta associação (Johannes et al., 2000; Shabsigh e Anastasiadis, 2003; Bansal et al., 2005; Mulhall et al., 2006; Burke et al., 2007). Investigações em modelos animais mostraram que alterações neurais (Zotova et al., 2008) e vasculares (Kovanecz et al., 2009) podem estar envolvidas neste processo.

Doenças vasculares ocorrem com frequência no Diabetes Mellitus crônico; microangiopatia, aterosclerose e hipertensão são frequentemente observadas em pacientes diabéticos. Diferentes estudos em ratos mostraram a relação entre essas afecções e a ocorrência de alterações morfológicas nas artérias mesentéricas (Vranes et al., 1999; Jandeleit-Dahm et al., 2000) e artéria aorta (Peiró et al., 1998).

Foi descrito que o DM pode causar alterações em elementos estruturais do pênis (Abidu-Figueiredo et al., 2010). Porém, na literatura consultada, não foram encontrados trabalhos analisando as alterações morfológicas vasculares penianas no diabetes experimental.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus é um distúrbio crônico do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. Um aspecto característico do DM consiste na resposta secretória defeituosa ou deficiente da insulina, que se manifesta na utilização inadequada dos carboidratos (glicose), com consequente hiperglicemia.

Cerca de 7% da população mundial, ou seja, aproximadamente 300 milhões de pessoas padecem de diabetes, tornando-o uma das doenças mais comuns.

No Brasil um estudo foi realizado para estimar a prevalência do DM e a tolerância à glicose diminuída na população urbana de São Carlos (SP), com 1.116 voluntários com idade compreendida entre de 30 a 79 anos. As prevalências gerais do DM e tolerância à glicose diminuída foram 13,5% e 5%, respectivamente. O estudo apontou que embora tenha havido avanços no diagnóstico da doença, houve aumento na prevalência de DM em comparação a estudos anteriores no Brasil e na região (Bosi, 2009).

A classificação atualmente recomendada incorpora o conceito de estágios clínicos do DM, desde a normalidade, passando para a tolerância à glicose diminuída e/ou glicemia de jejum alterada, até o DM propriamente dito (Genuth et al., 2003; Stumvoll et al., 2005). Essa classificação baseia-se na etiologia do DM, eliminando os termos “diabete mellitus insulino-dependente” e “não-insulinodependente”.

A DM tipo 1 resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas com tendência a cetoacidose. Inclui casos decorrentes de doença autoimune e aqueles nos quais a causa da destruição das células beta não é conhecida.

A DM tipo 2 resulta, em geral, de graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. A maioria dos pacientes tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais, como durante infecções graves.

A categoria “outros tipos de DM” contém várias formas de DM, decorrentes de defeitos genéticos associados a outras doenças ou com uso de fármacos diabetogênicos.

A DM é considerada um importante problema de saúde pública devido aos altos índices epidemiológicos e ao impacto negativo trazido para sociedade. Suas complicações levam o indivíduo à enfermidade precoce e diminuem a qualidade de vida e sobrevida dos doentes. Além disso, deve-se considerar os prejuízos econômicos causados pelo alto custo do tratamento e freqüentes hospitalizações (Molitch et al., 2004; Boulton et al., 2005).

As conseqüências em longo prazo incluem a nefropatia com possível evolução para insuficiência renal, a retinopatia, com a possibilidade de cegueira e/ou neuropatia, com risco de aparecimento de úlceras nos pés, amputações, artropatia de Charcot e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual (Molitch et al., 2004; Boulton et al., 2005).

Alterações na morfologia vascular no diabetes têm sido relatadas tanto em estudos experimentais como em estudos clínicos (Hadcock et al., 1991). A DM é considerada fator de risco para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares, como doença coronariana, doença arterial periférica e hipertensão (Karasu, 2010).

## **1.2 Hiperglicemia e dano vascular**

A hiperglicemia é a causa do início do dano tecidual em DM, quer através de repetidas alterações agudas no metabolismo da glicose celular, ou pelo acúmulo de biomoléculas glicosiladas e produtos finais da glicosilação (Karasu, 2010).

Dos eventos metabólicos associados à hiperglicemia que parecem estar envolvidos na gênese de complicações vasculares, a glicosilação não enzimática (GNE) é apontada como principal fator causal (Monnier et al., 1986).

A GNE ocorre quando alguns dos produtos iniciais da glicosilação no colágeno e em outras proteínas de vida longa da parede dos vasos, em vez de se dissociarem, sofrem uma série lenta de rearranjos químicos para formarem produtos finais irreversíveis da glicosilação avançada - chamados *Advanced Glycosilation*

*Ends* (AGE's) - que se acumulam durante a vida da parede vascular. O conjunto de eventos que leva à formação dos AGE's é conhecida como reação de Maillard (Kume et al., 1995; Takeuchi et al., 2001).

Os AGE's, particularmente no colágeno, parecem estar correlacionados com a gravidade das complicações vasculares na DM. Em humanos, a deposição de AGE's foi correlacionada diretamente com a lesão aterosclerótica da túnica íntima na aorta (Kume et al., 1995).

O aumento da formação de AGEs intracelulares na hiperglicemia crônica, resulta em uma perda de integridade molecular, interrupção na sinalização celular e na homeostase, seguida por inflamação e lesões teciduais, tais como disfunção endotelial, rigidez arterial e complicações microvasculares (Karasu, 2010).

### **1.3 Modelo animal**

O uso de animais em pesquisas biomédicas tem sido recomendado para aperfeiçoar e validar procedimentos já existentes, desenvolvimento de novos materiais e compreensão dos diferentes processos fisiológicos e patológicos porque não há modelos *in vitro* capazes de imitar completamente a complexidade do organismo humano (Fagundes e Taha, 2004). Os modelos animais permitem controlar numerosas variáveis que normalmente não podem ser obtidas em estudos com seres humanos (Bozkurt e Pekiner, 2006).

Existe grande similaridade entre o pênis do coelho e o pênis humano, tanto em fatores morfológicos quanto fisiológicos e neurológicos (Taub et al., 1993; Bischoff, 2001). Por isso, o pênis do coelho é utilizado em trabalhos experimentais, servindo como modelo para o estudo de várias patologias que acometem os seres humanos como, por exemplo, a disfunção erétil (Qiu et al., 2000; Yesilli et al., 2001; Maia et al., 2006) e é considerado um modelo biológico mais adequado que o rato, que apresenta um pênis do tipo fibro-elástico (Pinheiro et al., 2000), no qual observa-se a presença de osso peniano (Beresford e Burkart, 1977) e protusão peniana durante a cópula com poucas variações em seu diâmetro (Hafez e Hafez, 2004).

### 1.3.1 Morfologia do pênis do coelho

O pênis de coelho é classificado morfologicamente como do tipo vascular, e é dividido em raiz ou porção fixa, corpo ou porção intermediária e glândula ou extremidade livre. A raiz é formada pelos pilares (corpos cavernosos) e pelo bulbo do pênis (corpo esponjoso). O corpo se estende desde a raiz até a glândula e é formado pelo corpo cavernoso e esponjoso. A glândula é formada por corpo esponjoso (Nickel et al., 1979).

O corpo cavernoso se localiza na região dorsolateral do pênis e o corpo esponjoso na região ventral circundando a uretra. Ambas as estruturas são cobertas por uma densa cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea. A túnica albugínea projeta pilares intra-cavernosos ou septos, principalmente no corpo cavernoso (Maia et al., 2006) (Fig. 1).

A ereção do pênis é um processo hemodinâmico controlado por impulsos nervosos sobre o músculo liso das artérias do pênis e sobre o músculo liso das trabéculas que cercam os espaços vasculares dos corpos cavernosos (seios venosos). A ereção acontece quando impulsos vasodilatadores do sistema nervoso parassimpático causam o relaxamento dos vasos penianos e do músculo liso dos corpos cavernosos. A vasodilatação nas artérias penianas, bem como a abertura dos seios venosos aumenta o fluxo de sangue que preenche o corpo cavernoso e promove a rigidez do pênis (Lue et al., 1983).

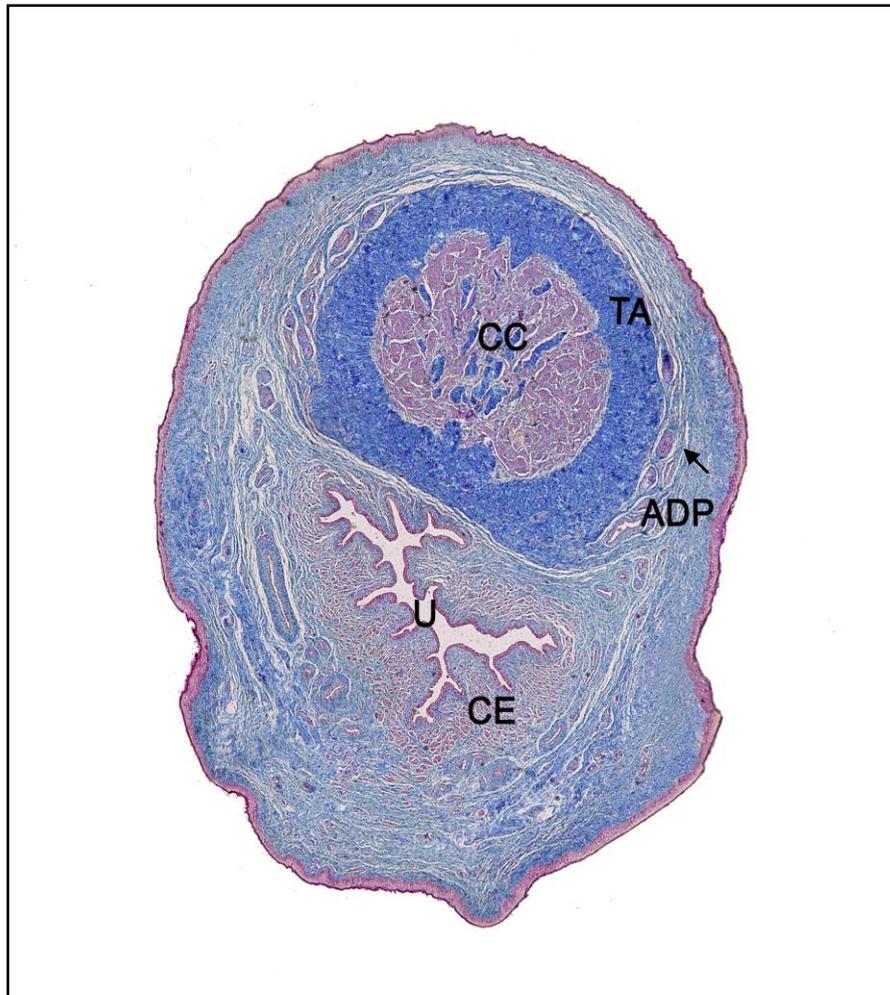


Figura 1: Fotomicrografia de corte transversal do corpo do pênis de coelho. CC= Corpo Cavernoso, TA= Túnica Albugínea, U= Uretra, CE= Corpo Esponjoso ADP= Artéria dorsal do pênis . Tricrômico de Masson 40X.

### 1.3.2 Vascularização peniana

O principal vaso responsável pela irrigação do pênis é a artéria peniana, que é um ramo da artéria pudenda interna. A artéria peniana se divide em dois ramos que formam as artérias profunda e dorsal do pênis ao nível do arco isquiático. A artéria profunda do pênis penetra na túnica albugínea, e forma a rede arterial do corpo cavernoso. Por outro lado, a artéria dorsal do penis emite três pequenos ramos para o músculo isquiocavernoso e ao nível da fixação desse músculo emite dois pequenos ramos para o prepúcio. O curso de ambas as artérias segue a superfície dorsolateral do pênis em direção à glândula onde sofrem anastomose (Ozgel et al., 2003) (Fig. 2, 3).

A artéria dorsal do pênis (ADP) é uma artéria do tipo muscular e pode ser identificada facilmente em cortes transversais. A ADP pode ser considerada, a partir de uma perspectiva histológica, como vaso sanguíneo de eleição para demonstrar os efeitos do envelhecimento e de diversas afecções, inclusive a DM, que podem potencialmente afetar a artéria cavernosa e seus ramos, induzindo alterações na composição da parede. Além disso, a ADP é importante para a manutenção da homeostase e função dos tecidos penianos (Barra e Iacono, 1997).

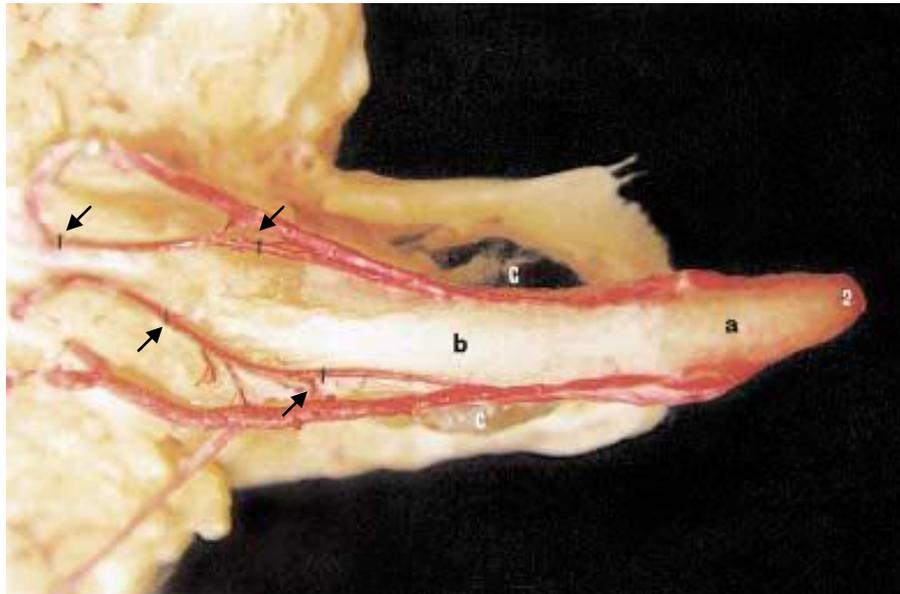


Figura 2: Fotomicrografia mostrando o pênis de Coelho Nova Zelândia (visão ventral). 1) Ramos da artéria dorsal do pênis, 2) Anastomose entre a artéria dorsal do pênis direita e a artéria dorsal do pênis esquerda, a) Glândula, b) corpo, c) glândulas prepuciais. Ozgel et al. (2003).

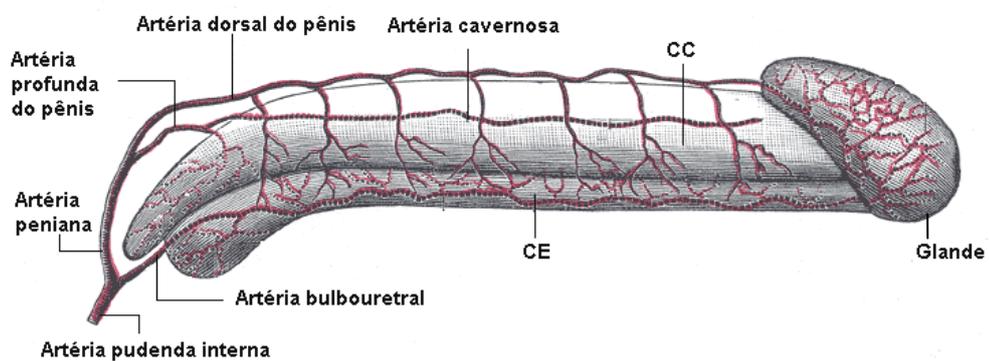


Figura 3: Representação esquemática mostrando a vascularização do pênis humano. CC= Corpo cavernoso. CE= Corpo esponjoso. (Gray, 1988).

## 2 OBJETIVO

Embora saiba-se que o DM está relacionado com a DE e que pode comprometer os vasos sanguíneos, não foram encontrados na literatura trabalhos mostrando as alterações morfológicas nos vasos penianos, nem tampouco nos seios vasculares do corpo cavernoso, durante o DM.

Assim, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da hiperglicemia sobre a estrutura vascular peniana, utilizando como modelo biológico o coelho Nova Zelândia.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram avaliadas histomorfometricamente as alterações em ambos os grupos da espessura e área da túnica média, e a densidade de células de músculo liso da artéria dorsal do pênis (ADP) e área do seio vascular cavernoso. A túnica adventícia e a túnica íntima da ADP foram avaliadas qualitativamente.

#### **3.1 Comitê de ética**

O projeto e o protocolo de pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) (Anexo-1).

#### **3.2 Seleção e preparação dos animais**

Foram selecionados vinte coelhos Nova Zelândia, provenientes do Setor de Cunicultura do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os coelhos recém nascidos foram selecionados aleatoriamente, sendo um filhote de cada fêmea parida.

Os animais foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (LCE – FCM – UERJ). Os animais foram alojados em gaiolas individuais, mantidos em temperatura ambiente, e receberam água à vontade e 120g de ração comercial duas vezes por dia (ração peletizada, para coelhos em fase de reprodução e crescimento). O experimento foi iniciado quando os animais completaram 2 meses de idade, com peso variando entre 1,5 a 2,0 kg de peso vivo.

Foram estabelecidos 2 grupos com 10 animais cada, o grupo diabético e o grupo controle. Para indução do Diabetes, os animais foram anestesiados com Xilazina (5mg/kg IM) e Ketamina (20mg/kg IM). Os 10 coelhos do grupo diabético

receberam aloxano na dose de 100mg/kg, via endovenosa na veia marginal da orelha (Simopoulos et al., 2001; Bozkurt e Pekiner, 2006), e os animais do grupo controle receberam solução salina endovenosa.

Para aferição da glicemia, foram coletadas, de todos os animais, amostras de sangue através da veia marginal da orelha 24, 48 e 72 horas após a indução, e semanalmente até o término do experimento. A quantificação dos níveis séricos de glicose foi feita utilizando o glicosímetro OneTouch Ultra (Johnson & Johnson Company, USA) respeitando-se sempre um jejum de 10 horas. A coleta foi realizada através de punção com agulha fina (13 x 4,5) na extremidade da orelha. Foram considerados diabéticos, os coelhos com glicemia de jejum de  $\geq 126$ mg/dl. Decorridas 10 semanas do estabelecimento do Diabetes, todos os animais (grupo controle e diabético) foram eutanasiados com overdose de Thiopental sódico endovenoso.

### **3.3 Processamento histológico**

Os pênis foram dissecados e sofreram uma primeira clivagem retirando-se 2 fragmentos do corpo do pênis. Um fragmento foi fixado em Líquido de Bouin e o outro em formalina 10% tamponada (pH 7.3).

Todo material foi processado para inclusão em parafina seguindo a técnica de rotina. Cortes de 5  $\mu$ m de espessura foram obtidos e posteriormente corados por métodos histológicos, histoquímicos e imunohistoquímicos.

### **3.4 Colorações histológicas e histoquímicas**

Foram utilizadas as técnicas-padrão de coloração pelo Tricrômio de Masson (Bancroft e Cook, 1994) para uma avaliação inicial dos preparados. Para a observação da birrefringência do colágeno na artéria dorsal do pênis foi feita a técnica de coloração pelo vermelho de Picro Sirius (Junqueira et al., 1979). Para análise das alterações do endotélio foi realizada a técnica histoquímica do Ácido

periódico-Reativo de Schiff (PAS) (Bancroft e Cook, 1994). Os cortes foram clarificados em xilol e hidratados em sequência regressiva de concentração de álcool, desde o álcool absoluto até o álcool 70%. Após a lavagem em água, foram realizadas as técnicas específicas para cada coloração, desidratação em álcool com concentrações progressivas até o álcool absoluto, clarificação em xilol e montagem com lamínula.

#### 3.4.1 Tricrômio de Masson

Técnica histológica de rotina que permite evidenciar o colágeno em azul e as fibras musculares lisas em vermelho (Bancroft e Cook, 1994).

#### 3.4.2 Picrosirius Red

A técnica do Picrosirius red seguida de microscopia de polarização pode mostrar as variações na espessura das fibras de colágeno, sendo indicativo de fibras de colágeno dos tipos I e III. A diferença de cor observada após a polarização é o resultado da espessura das fibras assim como do arranjo do colágeno. A coloração pelo método do Picrosirius faz com que grande quantidade de moléculas de sirius red, de caráter ácido e alongadas, disponham-se paralelamente às moléculas do colágeno, o que provoca aumento considerável da birrefringência das fibras que contêm colágeno quando observadas a luz polarizada (Junqueira et al., 1979).

#### 3.4.3 Ácido periódico-Reativo de Schiff (PAS - Fucsina Básica de Schiff)

O reagente de Schiff caracteriza-se por apresentar os grupos cromóforos da fucsina básica quebrados por sulfuração para formar uma solução incolor. Na presença de grupamentos aldeídicos livres é formado um composto corado e

insolúvel similar ao original. O ácido periódico (McManus, 1948) e a oxona são os dois agentes oxidantes mais comumente utilizados, atuando nas seqüências duplas 1-2 glicol (H-C-OH) dos hidratos de carbono até a formação de di-aldeído (H-C=O). Por este método, complexos de polissacarídeos neutros coram-se em vermelho, indicando PAS positividade.

Nas artérias, a técnica histoquímica do PAS auxilia na evidenciação de possíveis alterações nas células endoteliais e membrana basal da túnica íntima (Bancroft e Cook, 1994).

### 3.5 Imunohistoquímica

Foi utilizada a imunomarcção para a avaliação da densidade celular e cálculo das áreas da ADP e dos seios cavernosos.

Os cortes foram submetidos às técnicas de imunohistoquímica para anticorpo anti alfa-actina.

Foi realizada a técnica de Avidina-Biotina para a identificação de fibras musculares lisas, utilizando-se o anticorpo primário anti alfa-actina, na diluição de 1:400 em PBS (No A-2547 - Sigma Company).

Os cortes foram desparafinados em Xilol, hidratados em uma série decrescente de álcool etílico até a água e lavados em tampão fosfato tamponado (PBS) por cinco minutos. Em seguida, tratados por trinta minutos em temperatura ambiente com uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Após esta etapa, foram lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos cada) e incubados em câmara úmida a 37° graus C por trinta minutos com soro de cabra a 1% em PBS. Na seqüência, foram incubados em câmara úmida a 4° graus C por 12 a 14 horas com o anticorpo primário.

Os controles negativos foram realizados simultaneamente, com o anticorpo primário substituído por PBS, e controles positivos, usando fragmentos de tecido que apresentam os antígenos pesquisados, conforme prévia descrição literária.

Após este período, os cortes foram lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos cada) e incubados em câmara úmida em temperatura ambiente por trinta minutos com o anticorpo secundário biotinilado diluído em 1:100 em PBS. Após a incubação,

os cortes foram lavados em PBS e incubados com o complexo ABC (extravidina 1:100) por 30 minutos. Para a revelação da ligação dos antígenos com o complexo, os cortes foram tratados com solução de 393-diaminobezidina tetrahydrochloride, contendo 0,1% do volume em volume de peróxido de hidrogênio. Após a lavagem, o material foi desidratado para montagem com lamínula.

### 3.6 Histomorfometria computadorizada

As imagens para análise e quantificação foram obtidas em aumento de 40, 400 e 1000 vezes, em microscópio óptico Olympus BX-51 acoplado a uma câmera de vídeo Sony CCD, sendo a imagem dos campos microscópicos transferida para um monitor Sony KX14-CP1. Para cada animal, três cortes foram analisados em pontos diferentes. Para observação da refringência do colágeno nas lâminas coradas pelo Picro Sirius, foi adaptado o kit de polarização no mesmo microscópio.

As imagens em aumento de 400x foram digitalizadas para a mensuração de espessura e a área da túnica media da artéria dorsal do pênis. Para a mensuração da área ocupada pelos seios cavernosos as imagens em aumento de 4x foram binarizadas, ou seja, convertidas em escala de cores binária (preto e branco). Essas imagens foram analisadas utilizando software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Foram utilizadas as ferramentas *free hand selection* e *straight line* do Image J, respectivamente, para as medidas de área e espessura da parede da ADP (Fig. 4). A área da parede da ADP foi calculada subtraindo-se a área luminal do perímetro arterial. Para aferição da área total do CC foi utilizada a ferramenta *free hand selection*, circundando o CC com uma *mouse pen* associada a um tablet gráfico. Após a binarização, foi feita a medida da área dos seios cavernosos através da ferramenta *analyse particles*, que mede toda a área em preto na imagem (Fig. 5).

A quantificação das células musculares lisas da túnica média da ADP e das trabéculas do corpo cavernoso foi feita através do plug-in *cell\_counter.jar*.

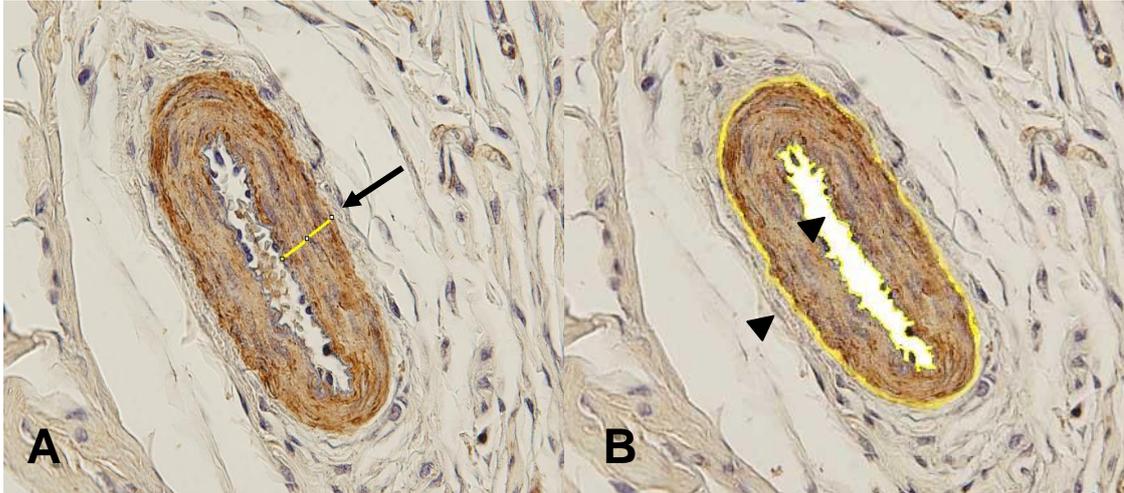


Figura 4: Fotomicrografia da ADP. A) Ferramenta de medida de espessura das tunicas media e intima artéria dorsal do pênis. B) Ferramenta de medida da área da parede da ADP. Imunomarcção com Anti-alfa-actina para músculo liso. x400.

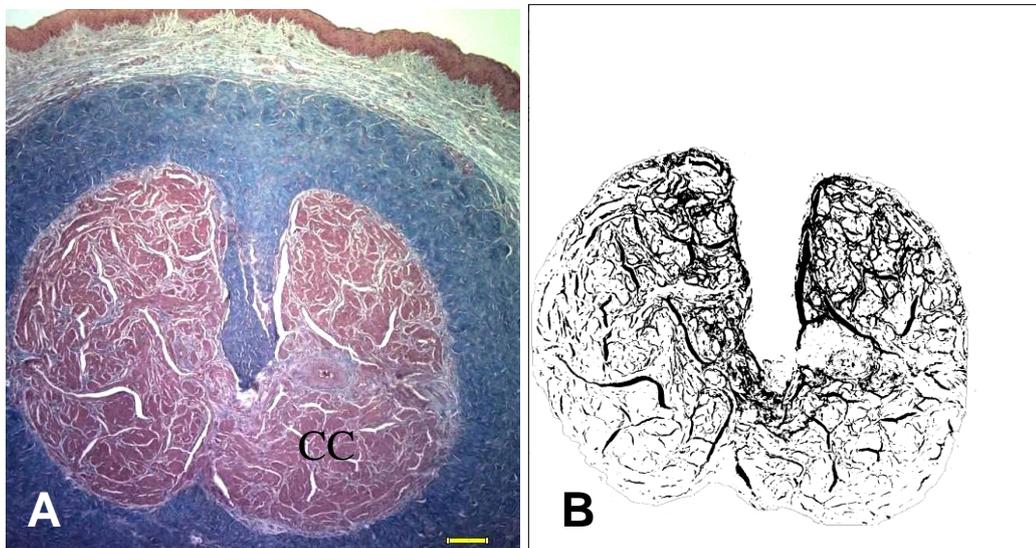


Figura 5: A) Fotomicrografia evidenciando o corpo cavernoso do pênis de coelho. Tricromio de Masson. x40. Barra de escala: 300  $\mu$ m. CC= Corpo cavernoso. B) Imagem digitalizada e binarizada, mostrando a área dos seios cavernosos em preto.

### 3.7 Análise estatística

Os valores utilizados para o cálculo da diferença da espessura e da área da ADP entre os grupos foram obtidos em  $\mu\text{m}$  e  $\mu\text{m}^2$  respectivamente. Para a avaliação da densidade nuclear foi feita a razão do número de núcleos das células musculares lisas pela área total da túnica media da ADP.

Para o cálculo da diferença estatística entre as áreas dos seios cavernosos foram obtidas a área total do corpo cavernoso e a área dos seios cavernosos em  $\text{mm}^2$ . A partir desses valores foram calculados os percentuais individuais de área ocupada pelos seios cavernosos. Posteriormente, foi calculada a média entre esses valores percentuais, comparando os grupos.

A análise estatística foi feita utilizando o software Graphpad *Instat* (Graphpad). O teste T de Student foi utilizado para averiguar as diferenças nos parâmetros analisados no grupo controle e no grupo diabético ( $p < 0,05$  considerado significativo).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Glicose sérica

A concentração de glicose no sangue após 72 horas da indução do diabetes pelo Aloxano, alcançou um valor médio de 150 mg / dL (Fig. 6). Posteriormente, este valor aumentou de forma constante nos animais diabéticos enquanto que, nos controles, a glicemia manteve o valor médio de aproximadamente 79 mg/dL durante todo o experimento.

No momento do sacrifício, 10 semanas após a indução, a glicemia dos coelhos diabéticos era de aproximadamente 350 mg / dL. Portanto, os coelhos tratados com aloxano permaneceram em uma condição de hiperglicemia por, pelo menos, 10 semanas.

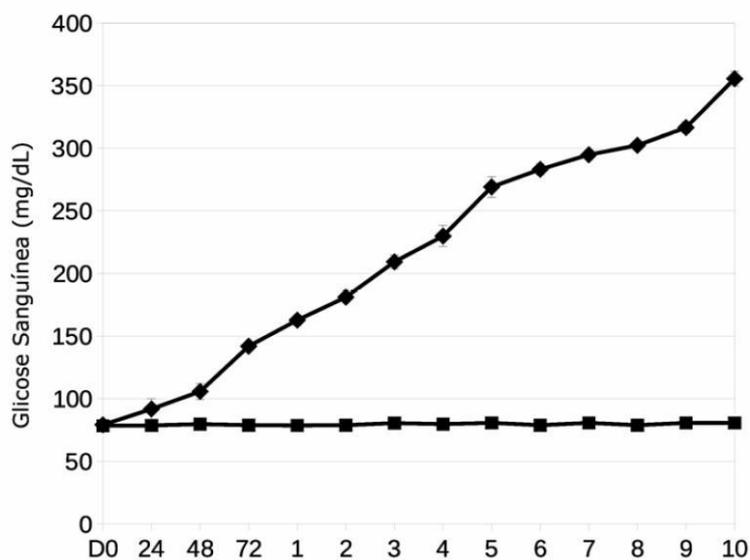


Figura 6: Gráfico mostrando a curva glicêmica em jejum dos coelhos do grupo controle (quadrado) e do grupo de coelhos diabéticos (losango), desde o dia zero até a décima semana do experimento.

## 4.2 Alterações morfológicas na ADP

### 4.2.1 Túnica íntima

Foram observadas alterações no endotélio da túnica íntima, com protrusão nuclear em direção a região luminal e visível vacuolização do citoplasma das células endoteliais (Fig. 7).

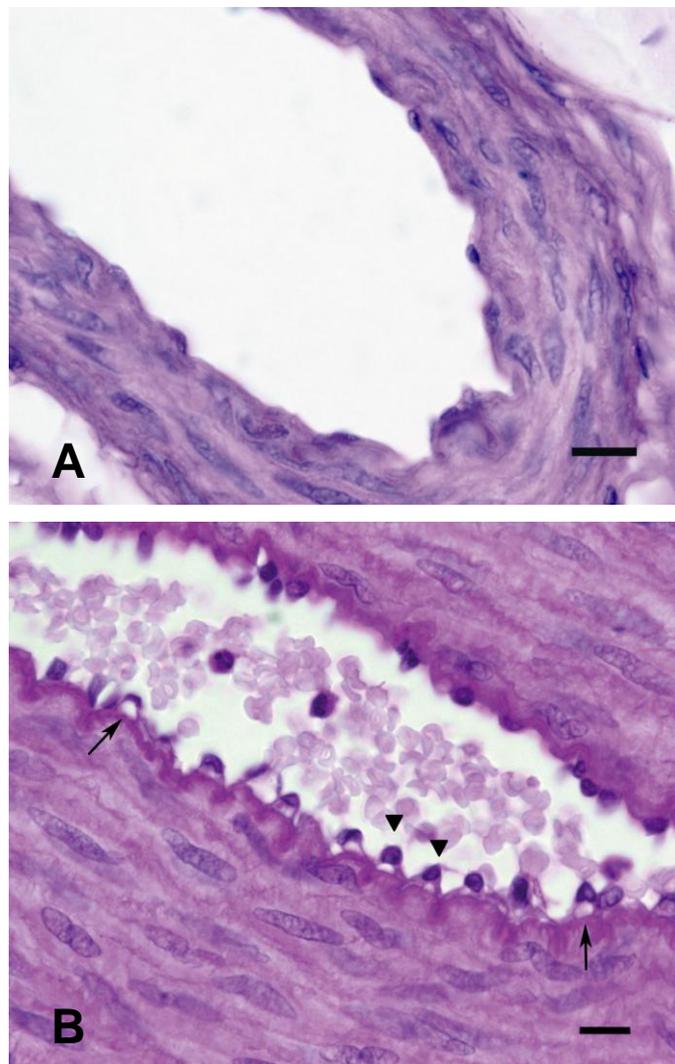


Figura 7: Fotomicrografia da túnica íntima da ADP de coelho. A) Coelho do grupo controle. B) Coelho do grupo diabético, mostrando vacuolização citoplasmática e protrusão nuclear nas células endoteliais. PAS. x1000. Barra de escala 10 $\mu$ m.

#### 4.2.2 Túnica média

Foram analisadas as alterações histomorfométricas na túnica media ADP e observou-se aumento significativo tanto na espessura como na área média no grupo diabético. Porém, não houve alterações quanto à densidade nuclear, referente às células musculares lisas da túnica media da ADP (Fig. 8 e Tabela 1).

Os valores médios da espessura da parede da ADP foram  $35.012 \pm 3.177 \mu\text{m}$  no grupo controle e  $44.330 \pm 8.434 \mu\text{m}$  no grupo diabético ( $P=0.0350$ ). A área média da parede da ADP foi  $12070.675 \pm 2938.2 \mu\text{m}^2$  e  $18221.298 \pm 6861.9 \mu\text{m}^2$  nos grupos controle e diabético, respectivamente ( $P=0.0179$ ).

O número médio de núcleos das células musculares lisas pela área da parede da ADP foi de  $0.007154 \pm 0.001954$  núcleos/ $\mu\text{m}^2$  em GC e  $0.004808 \pm 0.002069$  núcleos/ $\mu\text{m}^2$  em GD ( $P=0.0855$ ).

Tabela 1. Valores médios obtidos pela análise histomorfométrica da parede da ADP.

Parâmetro			P
	Grupo Controle	Grupo Diabético	
Espessura da parede da ADP	35,012 $\mu\text{m}$ (SD 3,177)	44,330 $\mu\text{m}^*$ (SD 8,434)	0.0350
Área da ADP (túnica íntima + túnica média)	12070,675 $\mu\text{m}^2$ (SD 2938,2)	18221,298 $\mu\text{m}^{2*}$ (SD 6861,9)	0.0179
Densidade nuclear** na ADP	0,007154 núcleos/ $\mu\text{m}^2$ (SD 0,001954)	0,004808 núcleos/ $\mu\text{m}^2$ (SD 0,002069)	0.0855

\* Estatisticamente significativo ( $p$  valor  $<0,05$ )

\*\* Núcleos das células musculares lisas.

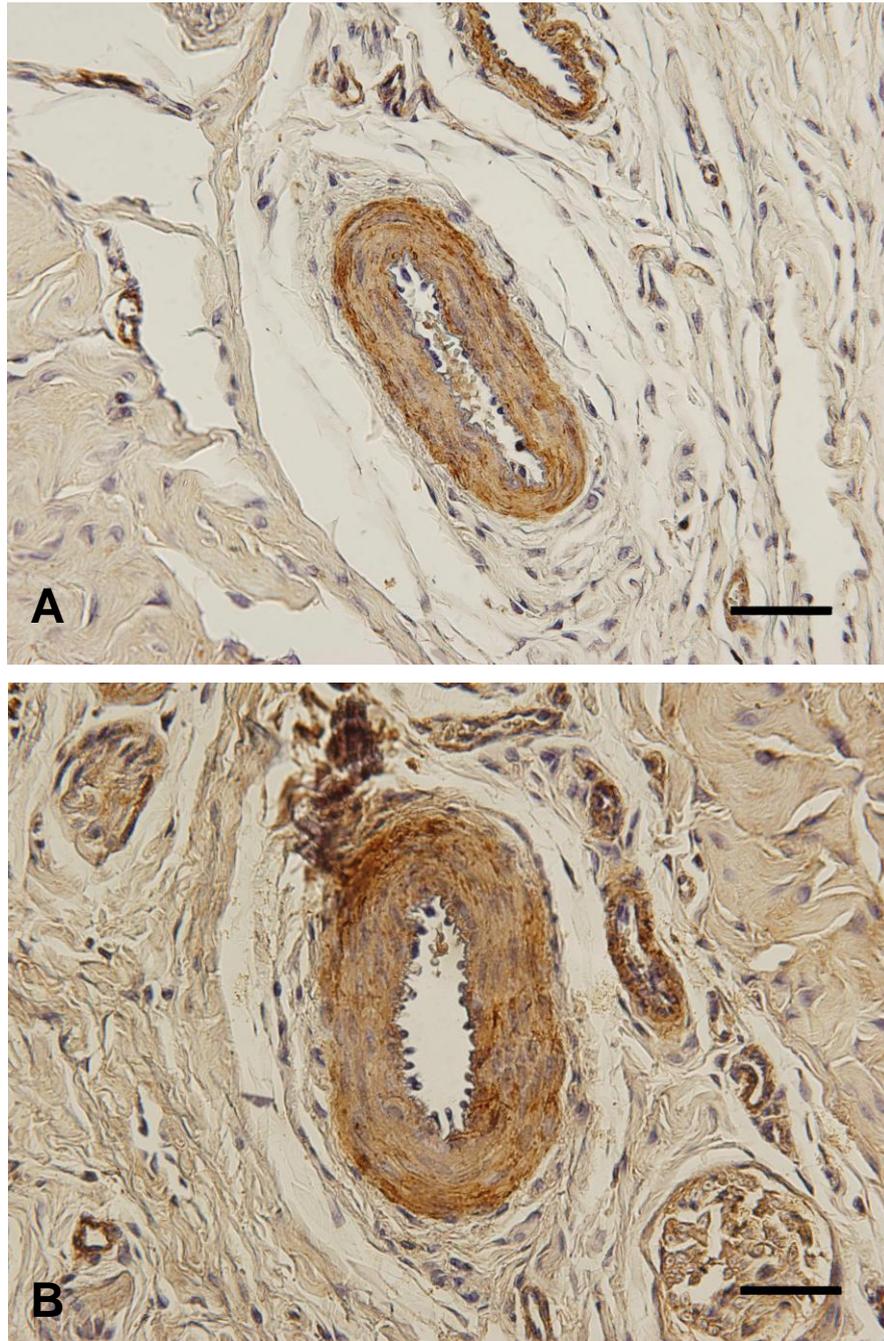


Figura 8: Fotomicrografias da artéria dorsal do pênis, mostrando a imunomarcção para músculo liso na túnica media. Anticorpo anti-alfa-actina de músculo liso. x400. Barra de escala 50µm. A) Grupo controle. B) Grupo diabético.

#### 4.2.3 Túnica adventícia

Foram observados diferentes padrões das fibras colágenas na túnica adventícia da ADP, com uma nítida birrefringência alaranjada, fibras espessas, no grupo controle, sugestivo de colágeno Tipo I, para uma birrefringência esverdeada nos animais diabéticos, sugestivo de fibras mais finas (Fig. 9).

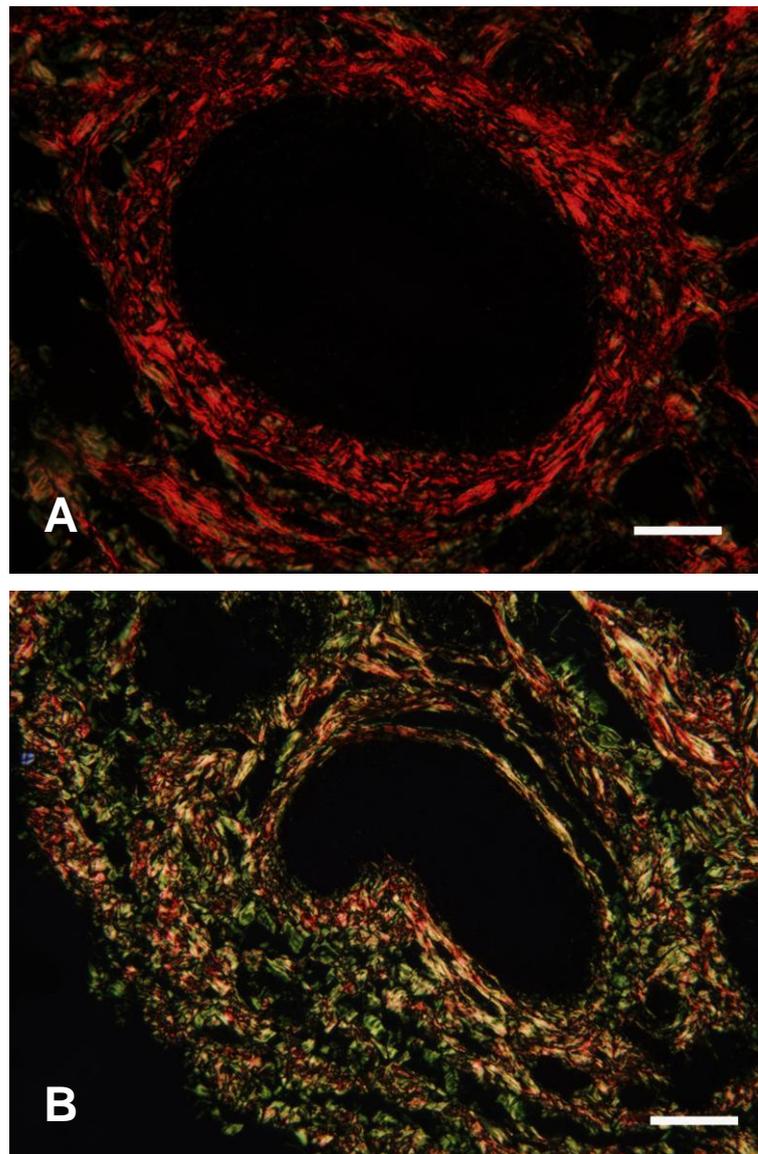


Figura 9: Fotomicrografias da artéria dorsal do pênis, mostrando a organização do colágeno na túnica adventícia, com predominância de fibras colágenas de cor vermelho alaranjado no grupo controle (A) e de cor verde do grupo diabético (B). Picro Sirius Red sob luz polarizada. x400. Barra de escala 50 $\mu$ m.

### 4.3 Análise morfométrica dos seios cavernosos

Houve diminuição significativa na área média ocupada pelos seios cavernosos no grupo diabético. Os valores encontrados para o GC e o GD foram, respectivamente,  $60.76 \pm 7.883\%$  e  $37.93 \pm 9.986\%$  ( $P=0,0013$ ). Entretanto não foi observada diferença significativa na densidade nuclear da musculatura lisa dos seios cavernosos entre os grupos controle e diabético (Fig. 11 e Tabela 2).

Tabela 2. Valores obtidos pela análise morfométrica dos seios cavernosos.

Parâmetros		
	Grupo controle	Grupo diabético
Área ocupada pelos seios cavernosos no CC (%)	60,76 % (SD 7,883)	37,93 % (SD 9,986)*
Valores médios da área do CC	1,866 mm <sup>2</sup> (SD 0,488)	2,584 mm <sup>2</sup> (SD 0,505)
Valores médios da area dos seios cavernosos	1,295 mm <sup>2</sup> (SD 0,485)	0,980 mm <sup>2</sup> (SD 0,315)

\*Estatisticamente significativo

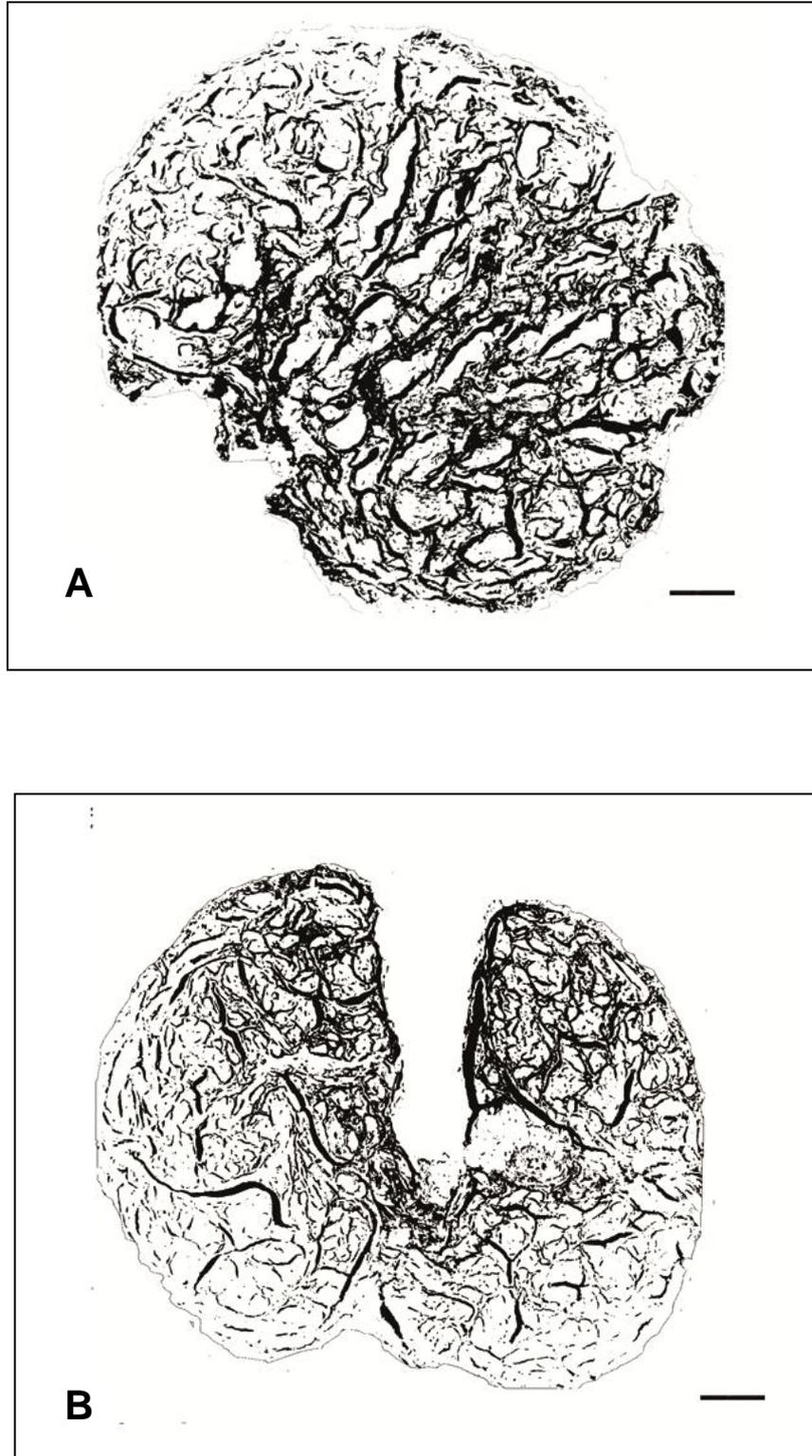


Figura 10: Área dos seios cavernosos do pênis de coelho. Imagem binarizada. x40. Barra de escala 200µm. A) Coelho do grupo controle. B) Coelho do grupo diabético.

## 5 DISCUSSÃO

O tecido erétil do pênis, especificamente a musculatura lisa cavernosa e o músculo liso das paredes arteriais e arteriolares, desempenham um papel fundamental no processo de ereção (Lue et al., 1983). O DM está associado a doenças micro e macro vasculares, que se manifestam na morfologia vascular alterada (Haffner et al., 1998).

Um estudo realizado por Wang e colaboradores (1993) utilizando ultra-som duplex após a injeção intracavernosa de prostaglandina E1, observou alta prevalência (> 75%) de insuficiência arterial peniana entre os homens diabéticos com disfunção erétil. Em estudo utilizando culturas de células aórticas provenientes de coelhos com diabetes induzida por Alloxano, a hiperglicemia reduziu o número de células musculares lisas e aumentou a densidade celular nos coelhos testados quando comparado aos animais normais, sugerindo que a hiperglicemia leva a alterações permanentes na dinâmica de proliferação dessas células (Alipui et al., 1993).

O processo de espessamento da parede vascular que ocorre no diabetes pode acometer vasos sanguíneos em diversos pontos do organismo, e foi estudado nas artérias mesentéricas (Cooper et al., 1994; Jandeleit-Dahm et al., 2000), renais (Vranes et al., 1999) e na aorta (Hadcock et al., 1991). Entretanto, essa mudança ainda não foi descrita em artérias penianas. O mecanismo desse espessamento na DM ainda não está perfeitamente esclarecido, uma vez que as células musculares lisas, principal componente da túnica média, podem se expandir por dois processos distintos: hiperplasia (aumento do número de células) ou hipertrofia (aumento no volume das células). O processo de hiperplasia da neointima (neointimal hyperplasia) é bem conhecido em diabéticos, levando a estenose vascular, com aumento na proliferação de células musculares lisas e migração destas da túnica média para a íntima (Varu et al., 2010).

Entretanto, em nosso trabalho, verificamos um aumento da área ocupada pela musculatura lisa e da espessura da parede vascular na ADP dos coelhos diabéticos, mas sem um aumento na densidade nuclear, indicativo de que houve hipertrofia das células musculares lisas na túnica média. Nossos achados estão de acordo com Vranes e colaboradores (1999) que, utilizando citometria de fluxo e autoradiografia,

analisaram artérias mesentéricas espessadas em ratos diabéticos mostrando aumento no tamanho das células musculares lisas da túnica média. Essa associação entre a diabetes e a hipertrofia do músculo liso também foi observada em outros órgãos do sistema urogenital, como na bexiga (Lincoln et al., 1984; Uvelius, 1986).

O remodelamento vascular atingiu o componente fibroso da túnica adventícia, com nítida mudança no padrão das fibras colágenas, que se apresentaram espessas no grupo controle (birrefringência alaranjada das fibras sob luz polarizada, sugestivo de colágeno Tipo I) e no grupo diabético foi observada birrefringência esverdeada (sugestivo de fibras mais finas). Mudanças no padrão do colágeno foram previamente mostradas em artérias mesentéricas de ratos com diabetes streptozotocina-induzido (Vranes et al., 1999). A reorganização do colágeno na matriz extracelular, tanto na parede da artéria dorsal do pênis como na região periarterial, indica que essas alterações ocorreram simultaneamente ao processo de hipertrofia vascular associada ao diabetes.

Nesse estudo observamos alterações na camada íntima como protusão nuclear em direção à luz do vaso e uma visível vacuolização do citoplasma endotelial. Essa vacuolização foi também observada através de microscopia eletrônica por Hadcock e colaboradores (1991), em células endoteliais da aorta de coelhos com diabetes aloxano-induzido. Em células provenientes de cordão umbilical, esse processo parece estar ligado ao aumento da área mitocondrial (Cester et al., 1996). Alterações mitocondriais e nucleares caracterizam o processo de lesão reversível denominado degeneração vacuolar (Robbins, 2000). A hiperglicemia quimicamente induzida foi um dos mecanismos propostos em estudo como estimulador do estresse oxidativo, que leva a essas alterações (Hadcock et al., 1991; Lin et al., 1993).

A glicose por tem um pequeno efeito proliferativo na musculatura lisa das artérias coronárias, mas a hiperglicemia crônica potencializa a resposta a fatores de crescimento tais como o PDGF e TGF  $\beta$  (Suzuki et al., 2001; Little et al., 2003; Dilley et al., 2005).

A hipertrofia causada pelo diabetes nas células musculares lisas na parede de artérias mesentéricas pode estar relacionada com o balanço Na/H (Dilley et al., 2005). Os canais de Na/H das células musculares lisas são sensíveis à redução no pH intracelular, que ocorre devido à cetoacidose associada ao DM, e este processo

levaria à ativação máxima do canal iônico de Sódio/Hidrogênio (Na/H exchanger). No diabetes, essa ativação pode ser uma resposta tanto à glicose elevada quanto aos fatores de crescimento, que podem conduzir à hipertrofia (Jandeleit-Dahm et al., 2000).

As complicações vasculares no diabetes parecem ser de origem multifatorial, mas o stress glico-oxidativo foi apontado como unificador entre os diversos transtornos do DM (McNally et al., 1994; Rizzoni and Rosei, 2009). Os produtos finais da glicosilação avançada (AGEs) desempenham papel relevante na diminuição da distensibilidade vascular (Aronson, 2003; Karasu, 2010). O processo bioquímico de produção dos AGEs se encontra acelerado no DM devido ao estresse oxidativo crônico induzido pela hiperglicemia (Giugliano et al., 1995; Evans et al., 2002; Goh e Cooper 2008; Karasu 2010).

O comprometimento vascular observado na ADP no diabetes não foi restrito à parede arterial. Foi observado também diminuição de 37 % na área dos seios cavernosos. Essa diminuição pode ser explicada pelo aumento da área das trabéculas devido ao aumento da densidade volumétrica do músculo liso verificado por Abidu-Figueiredo e colaboradores (2010).

Essas alterações, indicam que as modificações vasculares na DM afetam todas as camadas da parede arterial e também a estrutura dos seios cavernosos. O espessamento da parede arterial e a diminuição dos espaços na musculatura cavernosa podem estar diminuindo a oferta de sangue para os tecidos penianos, o que afeta a hemodinâmica do órgão, levando à disfunção erétil.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o diabetes experimental aloxano-induzido causa importantes modificações na estrutura vascular peniana, afetando as túnicas íntima, média e adventícia dos vasos sanguíneos e promove redução significativa da área dos seios cavernosos após 10 semanas de hiperglicemia.

## REFERÊNCIAS

- Abidu-Figueiredo M., Ribeiro I.C., Chagas M.A., Cardoso L.E.M., Costa W.S. e Sampaio F.J.B. The penis in diabetes: Structural analysis of connective tissue and smooth muscle alterations in a rabbit model. *BJU Int.* 2010, 108: 400-404.
- Alipui C., Ramos K. e Tenner Jr T.E. Alterations of rabbit aortic smooth muscle cell proliferation in diabetes mellitus. *Cardiovasc. Res.* 1993, 27: 1229–1232.
- Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J. Hypertens.* 2003, 21:3-12.
- Bancroft J.D. e Cook H.C. Connective tissues. Em: *Manual Of Histological Techniques And Their Diagnostic Application*. Primeira ed. Churchill Livingstone. Edinburgh. 1994, pp 42.
- Bansal T.C., Guay A.T., Jacobson J., Woods B.O. e Nesto R.W. Incidence of metabolic syndrome and insulin resistance in a population with organic erectile dysfunction. *J. Sex. Med.* 2005, 2:96-103.
- Barra S. e Iacono F. Echo doppler flowmetric assessment of penile dorsal arteries and their hole in the erectile mechanism. *Eur. J. Radiol.* 1997, 25:67-73.
- Bastos A.L., Costa W.S. e Sampaio F.J.B. Concentration of elastic fibers in the male urethra during human fetal development. *BJU Int.* 2004, 94:620–623.
- Beresford W.A. e Burkart S. The penile bone and anterior process of the rat in scanning electron microscopy. *J. Anat.* 1977, 124:589-597.
- Bischoff E. Rabbits as models for impotence research. *Int. J. Imp. Res.* 2001, 13:146–148.
- Bosi P.L. Prevalência de diabetes melito e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* [online]. 2009, 53:726-732.
- Boulton A.J.M., Vileikyte L., Ragnarson-Tennvall G. e Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet.* 2005, 366:1719-24.
- Bozkurt N.B. e Pekiner C. Impairment of endothelium- and nerve-mediated relaxation responses in the cavernosal smooth muscle of experimentally diabetic rabbits: Role of weight loss and duration of diabetes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2006, 373:71-78.
- Burke J.P., Jacobson D.J., McGree M.E., Nehra A., Roberts RO., Girman C.J., Lieber M.M. e Jacobsen S.J. Diabetes and Sexual Dysfunction: Results From the Olmsted County Study of Urinary Symptoms and Health Status Among Men. *J. Urol.* 2007, 177:1438-1442.

Burnett A.L. General use of animal models for investigation of the physiology of erection. *Int. J. Imp. Res.* 2001, 13:135–139.

Cester N., Rabini R.A., Salvolini E., Staffolani R., Curatola A., Pugnali A., Brunelli M.A., Biagini G. e Mazzanti L. Activation of endothelial cells during insulin-dependent diabetes mellitus: a biochemical and morphological study. *Eur. J. Clin. Invest.* 1996, 26: 569-573.

Chitale K. Type 1 and type 2 diabetic-erectile dysfunction: Same diagnosis (ICD-9), different disease? *J. Sex. Med.* 2009, 6:262–268.

Cooper M.E., Rumble J., Komers R., Hecheng D., Jandeleit K. e Chou S.T. Diabetes-associated mesenteric vascular hypertrophy is attenuated by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Diabetes* 1994, 43:1221–1228.

Dilley R.J., Farrelly C.A., Allen T.J., Jandeleit-Dahm K., Cooper M.E., Morahan G. e Little J. Diabetes induces Na/H exchange activity and hypertrophy of rat mesenteric but not basilar arteries. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005, 70:201–208.

Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A. e Grodsky G.M. Oxidative stress and stress-activated signalling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 2002, 23:599-622.

Fagundes D.J. e Taha M.O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir. Bras.* 2004, 19:59-65.

Genuth S., Alberti K.G., Bennett P., Buse J., Defronzo R., Kahn R., Kitzmiller J., Knowler W.C., Lebovitz H., Lernmark A., Nathan D., Palmer J., Rizza R., Saudek C., Shaw J., Steffes M., Stern M., Tuomilehto J. e Zimmet P. Expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003, 26:3160-7.

Giugliano D., Ceriello A. e Paolisso G. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: Which role for oxidative stress? *Metabolism* 1995, 44:363-368.

Goh S.Y. e Cooper M.E. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008, 93: 1143-1152.

Gray H. Urogenital system. Em: *Gray's anatomy*. 29<sup>a</sup> ed. Goss C.M (ed) Lea & Febiger. Philadelphia. 1988, pp 1074.

Hadcock S., Richardson M., Winocour P.D. e Hatton M.W. Intimal alterations in rabbit aortas during the first 6 months of alloxan-induced diabetes. *Arterioscler. Thromb.* 1991, 11: 517-529.

Hafez E.S.E e Hafez B. *Anatomy of Male Reproduction*. Em: *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>a</sup> ed. Hafez B. e Hafez E.S.E. (eds). Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore. 2004, pp 10.

Haffner S.M., Letho S., Rönnemaa T., Pyörälä K. e Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N. Eng. J. Med.* 1998, 339:229-234.

Hsu G.L., Brock G., VonHeyden B., Nunes L., Lue T.F. e Tanagho E.A. The distribution of elastic fibrous elements within the human penis. *BJU Int.* 1994, 73: 566–571.

Jandeleit-Dahm K., Hannan K.M., Farrelly C.A., Allen T.J., Rumble J.R., Gilbert R.E., Cooper M.E. e Little P.J. Diabetes-induced vascular hypertrophy is accompanied by activation of Na<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> exchange and prevented by Na<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> exchange inhibition. *Circ. Res.* 2000, 87:1133-1140.

Johannes C.B., Araujo A.B., Feldman H.A., Derby C.A., Kleinman K.P. e McKinlay J.B. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: Longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J. Urol.* 2000, 163:460-463.

Junqueira L.C.U., Bignolas G. e Brentani R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* 1979, 11:447-455.

Karasu Ç. Glycoxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: Effects of antioxidant treatment. *Open Cardiovasc. Med. J.* 2010, 4:240-256.

Kovanecz I., Nolzco G., Ferrini M.G., Toblli J.E., Heydarkhan S., Vernet D., Rajfer J. e Gonzalez-Cadavid N.F. Early onset of fibrosis within the arterial media in a rat model of type 2 diabetes mellitus with erectile dysfunction. *BJU Int.* 2009, 103: 1396-1404.

Krane R.J., Goldstein I. e Saenz de Tejada I. Impotence. *New. Engl. J. Med.* 1989, 321:1648-1659.

Kume S., Takeya M., Mori T., Araki N., Suzuki H., Horiuchi S., Kodama T., Miyauchi Y. e Takahashi K. Immunochemical an ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am. J. Pathol.* 1995, 147: 654-667.

Lin S.J., Hong C.Y., Chang M.S., Chiang B.N. e Chien S. Increased aortic endothelial death and enhanced transendothelial macromolecular transport in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1993, 36:926-930.

Lincoln J., Haven A.J., Sawyer M. e Burnstock G. The smooth muscle of rat bladder in the early stages of streptozotocin-induced diabetes. *BJU Int.* 1984, 56: 24-30.

Little P.J., Allen T.J., Hashimura K., Nigro J., Farrelly C.A. e Dilley R.J. High glucose potentiates mitogenic responses of cultured ovine coronary smooth muscle cells to platelet derived growth factor and transforming growth factor-beta1. *Diab. Res. Clin. Pract.* 2003, 59: 93–101.

- Lue T.F., Takamura T., Schmidt R.A., Palubinskas A.J. e Tanagho E.A. Hemodynamics of erection in the monkey. *J. Urol.* 1983, 130:1237–1241.
- Lue T.F. e Tanagho E.A. Physiology of erection and pharmacological management of impotence. *J. Urol.* 1987, 137:829-836.
- Maia R.S., Babinski M.A., Abidu-Figueiredo M., Chagas M.A., Costa W.S. e Sampaio F.J.B. Concentration of elastic system fibers in the corpus cavernosum, corpus spongiosum, and tunica albuginea in the rabbit penis. *Int. J. Impot. Res.* 2006, 18: 121-125.
- McManus J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 1948, 23: 99-108.
- McNally P.G., Watt P.A.C., Rimmer T., Burden A.C., Hearnshaw J.R. e Thurston H. Impaired contraction and endothelium-dependent relaxation in isolated resistance vessels from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin. Sci. (Lond)* 1994, 87:31-36.
- Molitch M.E., DeFronzo R.A., Franz M.J., Keane W.F., Mogensen C.E., Parving H.H. e Steffes M.W. American Diabetes Association. Nephropathy in diabetes (Position Statement). *Diabetes Care.* 2004, 27:79-83.
- Monnier V.M., Vishwanath V., Frank K.E., Elmets C.A., Dauchot P. e Kohn R.R. Relation between Complications of Type I Diabetes Mellitus and Collagen-Linked Fluorescence. *N. Engl. J. Med.* 1986, 314:403-408.
- Mulhall J., Teloken P., Brock G. e Kim E. Obesity, dyslipidaemias and erectile dysfunction. A report of a subcommittee of the Sexual Medicine Society of North America. *J. Sex. Med.* 2006, 3:778–786.
- Nickel R, Schummer A e Seiferle E. *The anatomy of the domestic animals.* 1. ed. Berlin. Hamburg: Editora Verlag Paul Parey. 1979, pp. 78.
- Ozgel O., Dursun N., Cengelci A., e Ates S. Arterial supply of the penis in the New Zealand Rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.). *Anat. Histol. Embryol.* 2003, 32: 6-8.
- Peiró C., Ângulo J., Rodriguez-Mañas L., Llergo J.L., Vallejo S., Cercas E. e Sánchez-Ferrer C.F. Vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by glycosylated human oxyhaemoglobin. *Br. J. Pharmacol.* 1998, 125:637-644.
- Pinheiro A.C.A.D., Costa W.S., Cardoso L.E.M. e Sampaio F.J.B. Organization and relative content of smooth muscle cells and extracellular matrix components in the corpus cavernosum of the rat penis. *J. Urol.* 2000, 164: 1802–1806.
- Qiu Y., Kraft P., Lombardi E. e Clancy J. Rabbit corpus cavernosum smooth muscle shows a different phosphodiesterase profile than human corpus cavernosum. *J. Urol.* 2000, 164:882–886.

Rizzoni D. e Rosei E.A. Small artery remodeling in diabetes mellitus. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2009, 19: 587-592.

Robbins S.L., Cotran R.S. e Kumar V. Cellular injury and cellular death. Em: *Pathological basis of disease*. 6<sup>a</sup> ed. Schoen F.J. (ed). W.B. Saunders company. Philadelphia. 2000, pp 14.

Sattar A.A., Wespes E. e Schulman C.C. Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. *Eur. Urol.* 1994, 25: 142–144.

Sattar A.A., Haot J., Schulman C.C. e Wespes E. Comparison of anti-desmin and anti-actin staining for the computerized analysis of cavernous smooth muscle density. *Br. J. Urol.* 1996, 77: 266-270.

Shabsigh R. e Anastasiadis A.G. Erectile dysfunction. *Annu. Rev. Med.* 2003, 54: 153–168.

Simopoulos D.N., Gibbons S.J., Malysz J., Szurszewski J.H., Farrugia G., Ritman E.L., Moreland R.B. e Nehra A. Corporeal structural and vascular micro architecture with X-ray micro computerized tomography in normal and diabetic rabbits: histopathological correlation. *J. Urol.* 2001, 165:1776-1782.

Stumvoll M., Goldstein B.J. e Haeften T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005, 365: 1333-46.

Suzuki L.A., Poot R.G., Gerrity R.G. e Bornfeldt K.E. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: Lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes* 2001, 50: 851–860.

Takeuchi M., Yanase Y., Matsuura N., Yamagishi Si S., Kameda Y., Bucala R. e Makita Z. Immunological detection of a novel advanced glycation end-product. *Mol. Med.* 2001, 7:783-791.

Taub H.C., Lerner S.E., Melman A. e Christ G.J. Relationship between contraction and relaxation in human and rabbit corpus cavernosum. *Urology* 1993, 42:698-704.

Uvelius B. Detrusor smooth muscle in rats with alloxan-induced diabetes. *J. Urol.* 1986, 136:949–952.

Varu V.N., Ahanchi S.S., Hogg M.E., Bhikapurwala H.A., Chen A., Popowich D.A., Vavra A.K., Martinez J., Jiang Q., Saavedra J.E., Hrabie J.A., Keefer L.K. e Kibbe M.R. Insulin enhances the effect of nitric oxide at inhibiting neointimal hyperplasia in a rat model of type 1 diabetes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010, 299:772-779.

Vranes D., Cooper M.E. e Dilley J. Cellular mechanisms of diabetic vascular hypertrophy. *Microvasc. Res.* 1999, 57:8–18.

Wang C.J., Shen S.Y., Wu C.C., Huang C.H. e Chiang C.P. Penile blood flow study in diabetic impotence. *Urol. Int.* 1993, 50: 209–212.

Yesilli C., Yaman O. e Anafarta K. Effect of experimental hypercholesterolemia on cavernosal structures. *Urology* 2001, 57: 1184–1188.

Zotova E.G., Schaumburg H.H., Raine C.S., Cannella B., Tar M., Melman A. e Arezzo J.C. Effects of hyperglycemia on rat cavernous nerve axons: A functional and ultrastructural study. *J. Exp. Neurol.* 2008, 213: 439-447.

**APÊNDICE** – Artigo científico submetido: Sinusoidal Constriction and Vascular Hypertrophy in the Diabetes-Induced Rabbit Penis

## WJUR - Submission Confirmation

April 17th, 2012

**World Journal of Urology**

(WJUR) sithara.shenoy@springer.com por editorialmanager.com  
para mim

Dear Dr. Mauricio Chagas,

Thank you for submitting your manuscript, Sinusoidal Constriction and Vascular Hypertrophy in the Diabetes-Induced Rabbit Penis, to World Journal of Urology.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://wjur.edmgr.com/>

Your username is: chagas01

Your password is: chagas463

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

Alternatively, please call us at [+91 44 42197752](tel:+914442197752) anytime between 9.00 - 17.00 hrs IST/5.00 - 13.00 hrs CET.

With kind regards,  
Springer Journals Editorial Office

---

World Journal of Urology

## **Sinusoidal Constriction and Vascular Hypertrophy in the Diabetes-Induced Rabbit Penis**

Vivian A. Pereira<sup>1</sup> Marcelo Abidu-Figueiredo<sup>2</sup> Waldemar S. Costa<sup>1</sup> Francisco J.B. Sampaio<sup>1</sup> Marco A. Pereira-Sampaio<sup>1</sup> Mauricio A. Chagas<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Urogenital Research Unit. State University of Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup> Institute of Biology, Sector of Animal Biology. Rio de Janeiro Federal Rural University. Seropedica, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratory of Cellular and Extracellular Biomorphology. Department of Morphology, Federal Fluminense University, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author: Mauricio Alves Chagas, DVM, PhD

Laboratory of Cellular and Extracellular Biomorphology, Department of Morphology, Federal Fluminense University, Rua Professor Hernani Melo 101 São Domingos, Niterói 24210130, Brazil.

Tel: (+55) 21 26292455

Email 1: chagas.m@gmail.com

Email 2: chagas\_m@vm.uff.br

## **Abstract**

**Purpose:** Patients with diabetes mellitus (DM) have a high prevalence of erectile dysfunction. The aim of this study was to assess the morphological changes of penile vascular structures and the corpus cavernosum area in alloxan-induced diabetic rabbits. **Methods:** Twenty male rabbits (2 months old) were divided into two groups with 10 rabbits each, the control group (CG) and the diabetic group (DG). The animals from the DG received an intravenous injection of alloxan (100mg/kg) to induce DM. Ten weeks after the induction of DM, all animals were euthanized. Two fragments of the penile shaft were harvested and samples were processed and paraffin embedded. Sections (5 $\mu$ m) were cut and stained for histological and immunohistochemical markers. **Results:** Nuclear protrusion toward the lumen, and cytoplasmic vacuolization were observed in the tunica intima of the dorsal artery of the penis (DAP). There was no change in smooth muscle cell density in the tunica media of the DAP. The thicknesses of the tunica media for CG and DG were 35.01  $\mu$ m and 44.33  $\mu$ m, respectively. Nuclear density in the tunica media was 0.007 nuclei/ $\mu$ m<sup>2</sup> and 0.005 nuclei/ $\mu$ m<sup>2</sup>, respectively for CG and DG. The collagen fiber pattern of the tunica adventitia of the DAP was different between the CG and DG groups. There was a significant decrease in the area occupied by the cavernous sinuses in the DG ( $p = 0.0013$ ). **Conclusion:** Alloxan-induced DM in rabbits promotes important changes in penile vascular structures, thereby decreasing blood supply and affecting penile hemodynamics, leading to erectile dysfunction.

**Keywords:** Diabetes mellitus, Histomorphometry, Rabbit, Penis, Artery

## Introduction

The penile erection results from blood pressure increases, relaxation of smooth muscle, and reduction of venous return [1]. Smooth muscle cells, elastic system fibers, and collagen fibers are important penile structures involved in the erection process. These structures also give required rigidity to the penis when in a flaccid state [2, 3]. Several studies have reported functional and morphological changes that take place during the erection process in different animal models [4, 5], and also in humans [6].

Patients with diabetes mellitus (DM) have a high incidence of erectile dysfunction (ED). Several epidemiological studies have assessed the correlation between DM and ED [7]. Evaluation of animal models demonstrated that neural [8] and vascular [9] changes seen with DM may be associated with ED. Vascular diseases such as microangiopathy, atherosclerosis, and hypertension are often observed in patients with DM. A relationship between these vascular conditions and the occurrence of morphological changes in the mesenteric artery [10, 11] and aorta in rats [12] has been demonstrated.

Although some morphological changes in penile elements have been described in rabbits with DM [3], there is no data regarding morphological changes in penile blood vessels associated with DM. The rabbit penis is, morphologically, classified as a vascular type and has a dorsal corpus cavernosum (CC) and a ventral corpus spongiosum (CS), which surrounds the penile urethra. Both CC and CS are covered by a dense connective layer, the tunica albuginea, which originates intra-cavernosum pillars or septa, mainly in the CC [13]. There are pronounced resemblances between the rabbit and human penis in morphological, physiological, and neurological features [5, 14]. Therefore, the rabbit penis is often used as an

experimental model to assess ED [5, 13]. The rabbit penis is a more suitable model than the rat penis, which is classified as a fibro-elastic type [4], with a penile bone inside and a penile protrusion during mating with little variation in its diameter [15]. The arterial vascularization of the penis in the New Zealand rabbit was shown to be supplied by the penile artery arising from the internal pudendal artery, and its branches, and the deep artery and dorsal artery of the penis [16]. The dorsal artery of the penis (DAP) is the most easily identifiable vessel in cross-sections of the penis, and can be considered, from a histological perspective, as a representation of how DM and other disorders affect the cavernosal artery and its branches. Additionally, the DAP is important for the homeostasis and function of penile tissues [17]. Thus, the aim of this study was to assess the morphological changes in penile vascular structures and the area of the corpus cavernosum in diabetes-induced rabbits.

## **Materials and methods**

Twenty New Zealand rabbits, 2 months old, weighing 1.5 to 2.0 Kg, were used in this study. The study was approved by the Ethics Committee in Animal Research at the State University of Rio de Janeiro (CEA 227/2008). All animals were housed in individual cages at room temperature. They were provided with a commercial rabbit feed (120 g/day) and water *ad libitum*. The animals were divided into two groups of 10 animals, the control group and the diabetic group. All rabbits were anesthetized by using xylazine (5 mg/Kg IM) and ketamine (20 mg/Kg IM). Animals from the diabetic group received an intravenous injection of alloxan monohydrate (100 mg/Kg) for the induction of diabetes [18], while the control group received an intravenous injection of the same volume of saline.

Blood samples were drawn from the marginal ear vein from all animals for glucose evaluation after a fasting period of 10 hours, and at 24, 48, and 72 h post-diabetes induction and weekly thereafter until the end of the experiment. The measurement of serum glucose levels was made by using the One Touch Ultra Glucometer (Johnson & Johnson Company, Rio de Janeiro, Brazil). Rabbits with serum glucose levels 126 mg/dl or above were considered diabetic. Ten weeks after the induction of diabetes, all animals were euthanized by an intravenous injection of high dose sodium thiopental.

#### Histological procedures

The penises were histomorphometrically assessed in both the control and diabetic groups. The area of the CC sinuses, thickness and area of the tunica media, and density of the smooth muscle cells of the DAP were measured and recorded. The tunica adventitia and the tunica intima of the DAP were qualitatively evaluated. Two fragments of the penile shaft were collected and fixed; one was placed in Bouin's fluid and another in 10% buffered formalin (pH 7.3). All samples were routinely processed and embedded in paraffin. Sections (5 $\mu$ m) were cut for use in immunohistochemistry and histological staining.

Hematoxylin and eosin stain and Masson's trichrome stain were used for preliminary evaluation of the histological preparations. Picrosirius red stain, with a polarizing kit adapted to the microscope, was used to assess collagen birefringence in the DAP. The periodic acid-Schiff (PAS) technique was used to evaluate the endothelium [19].

### Immunohistochemistry

The avidin-biotin-peroxidase method was used to identify smooth muscle cells. Briefly, the sections were dewaxed in xylene, hydrated in a decreasing series of ethanol into water, and washed in phosphate buffered saline (PBS) for 5 minutes. Sections were then treated at room temperature with a 3% hydrogen peroxide solution in methanol to block endogenous peroxidase activity. Sections were then washed in PBS (3 x 5 minutes) and incubated with 1% goat serum in a moist chamber for 30 minutes at 37°C. Sections were then incubated with anti-alpha actin antibody (1:400, A-2547, Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA) in a moist chamber for 12 to 14 hours at 4°C. Negative controls were incubated with PBS instead of the primary antibody. Samples of a well-known tissue, with the antigen, were used for the positive controls, as previously described [4]. Finally, the sections were washed in PBS (3 x 5 minutes) and incubated with the biotinylated secondary antibody (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA) at 1:100 in a moist chamber for 30 minutes at room temperature. The immunostaining was used to estimate the smooth cell density and area of the DAP and CC sinuses.

### Histomorphometry

Selected images used for measurements and quantification were obtained using a light microscope (Olympus BX-41 coupled to a Sony CCD video camera), at magnifications of 4, 40, and 100 x. Three sections from each animal were analyzed at different histological fields. ImageJ 1.44p (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) was used to quantify the area DAP wall. The cell\_counter.jar plug-in was used to count the smooth muscle cells of the tunica media of DAP and of the trabeculae of the CC.

The percentual of area occupied by cavernous sinuses was obtained by the difference between the CC area and the cavernous sinus area (mm<sup>2</sup>). From these values we calculated the individual percentage of area occupied by the cavernous sinus, and then calculated the mean values for each group, comparing them.

#### Statistical analyses

All results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using the Graphpad InStat software version 3.01 for Windows XP, (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Student's t-test was used to test differences between the measurements from the control and diabetic groups, a value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

#### Serum glucose

After 72 hours from the intravenous injection of alloxan, serum glucose levels in rabbits reached 150 mg/dL, and rabbits were then considered diabetic. In subsequent samples, the serum glucose levels increased in the diabetes-induced animals. In contrast, the mean serum glucose concentration in the control group remained at 79mg/dL throughout the experiment. At euthanasia, 10 weeks after the achievement of diabetes, the serum glucose levels of the diabetic group was approximately 350 mg/dL. Therefore, rabbits in the diabetic group remained in a hyperglycemic state throughout the 10-week experimental period.

#### Morphological changes in the DAP

Nuclear protrusions toward the lumen and vacuolization of the cellular cytoplasm were observed in cells of the epithelium of the tunica intima in the DAP

(Fig. 1). The tunica media of the DAP was observed at high magnification to assess thickness and area (Fig. 2). There was significant changes in the thickness and area of DPA wall (Table 1). The values of DPA wall thickness were  $35.012 \pm 3.177 \mu\text{m}$  in CG and  $44.330 \pm 8.434 \mu\text{m}$  in DG ( $P=0.0350$ ). The mean DPA wall area was  $12070.675 \pm 2938.2 \mu\text{m}^2$  and  $18221.298 \pm 6861.9 \mu\text{m}^2$  in control and diabetic groups, respectively ( $P=0.0179$ .)

There was no significant change in smooth muscle cell density in the tunica media of the DAP between the groups. The ratio of nucleus per unit area was  $0.007154 \pm 0.001954$  nuclei/ $\mu\text{m}^2$  in CG and  $0.004808 \pm 0.002069$  nuclei/ $\mu\text{m}^2$  in the DG ( $P=0.0855$ ).

The collagen fibers of the tunica adventitia of the DAP were different between the control and diabetic groups. An orange birefringence and increased fiber thickness was observed in the control group. In the diabetic group, the birefringence was greenish and the fibers were thinner (Fig. 3).

#### Morphometric analysis of CC sinuses

There was a significant decrease in the mean area of the CC sinuses in the diabetic group compared to the control group (Fig. 4). The values of the mean area in CG and DG were  $60.76 \pm 7.883 \%$  and  $37.93 \pm 9.986 \%$ , respectively ( $P=0.0013$ ).

However, there was no significant difference in the cellular density in the CC sinuses between the control and the diabetic groups.

#### Discussion

The smooth muscle of both the CC and arterial wall of the DAP play an important role in penile erection [1]. DM is associated with micro- and macrovascular

diseases, which cause several morphological changes in the vascular wall [20]. Wang et al. [21] demonstrated a high prevalence (> 75%) of penile arterial insufficiency in diabetic men with erectile dysfunction, using duplex ultrasound after intracavernous injection of prostaglandin E1. Hyperglycemia in diabetic New Zealand rabbits has been shown to be associated with a reduction in the number of smooth muscle cells and increased cellular density when compared to normal rabbits, suggesting that hyperglycemia can lead to permanent changes in the dynamics of smooth muscle cell proliferation [22].

Diabetes can cause arterial wall thickening, as reported in the mesenteric artery, renal artery, and aorta [10, 11, 23]. However, this has not been previously described in penile arteries. The mechanism of arterial wall thickening associated with DM is not clear, because smooth muscle cells of the tunica media may increase in size as a result of hyperplasia or hypertrophy. Hyperplasia of the neointima associated with DM has been shown to result from smooth muscle cell proliferation in the tunica media and subsequent migration to the tunica intima, leading to vascular stenosis [24]. This migration process did not occur in the current study, and there was no disruption of the internal elastic layer. However, we demonstrated increased smooth muscle area and thickening of the DAP wall in diabetic rabbits, but with no change in the cellular density, suggesting hypertrophy of the smooth muscle cells in the tunica media. This finding agrees with Vranes et al. [10], who reported hypertrophy of the smooth muscle cells in the tunica media of thickened mesenteric arteries in diabetic rats. The relationship between DM and smooth muscle hypertrophy has also been demonstrated in the urinary bladder [25]. Hypertrophic remodeling in the DAP tunica media can increase vascular resistance and impair the

myogenic response, which is a key component of autoregulation of blood flow and stabilization of capillary pressure [20].

In this study, vascular remodeling associated with DM reached the tunica adventitia, changing the pattern of collagen fibers and reducing their thickness from that seen in the control group (orange birefringence), to thinner fibers (greenish birefringence). Changes in the pattern of collagen fibers have been previously demonstrated in the mesenteric artery of streptozotocin-induced diabetic rats [10]. Rearrangement of collagen fibers in the extracellular matrix, in both the wall of the DAP and periarterial region, suggests that it occurred simultaneously to vascular hypertrophy associated with DM. In this study, we also found nuclear protrusions toward the lumen and endothelial cytoplasmic vacuolization in the tunica intima. Hadcock et al. [23] have also reported cytoplasmic vacuolization in endothelial cells in the aorta of alloxan-induced diabetic rabbits. In cells from the umbilical cord, this vacuolization has been shown to be correlated with an increase in mitochondrial area [26]. Mitochondrial and nuclear changes are indicators of the reversible injury mechanism, vacuolar degeneration [27]. Chemically induced hyperglycemia may also cause oxidative stress leading to cellular vacuolization [23].

An increase in glucose promotes a small proliferative effect in the smooth muscle cells of coronary arteries. However, chronic hyperglycemia intensifies the response to growth factors such as platelet derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor-  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) [28]. The hypertrophy associated with DM in smooth muscle cells seen in the wall of the mesenteric artery could be associated with Na/H equilibrium [29]. The Na/H channels of smooth muscle cells are sensitive to intracellular pH reductions, that occur due to the ketoacidosis DM-related [27], which leads to higher activation of the Na/H exchanger. This Na/H exchanger

activation may be a response to higher amounts of glucose or to increased concentrations of the growth factors associated with DM, which can lead to hypertrophy [11].

The causes of vascular complications associated with DM are multifactorial, but glyco-oxidative stress has been shown to be a key factor among the several DM disorders [20]. Advanced glycation endproducts (AGEs) play an important role in the decrease of vascular distensibility. The biochemical production of AGEs has been shown to be increased in DM, because of the chronic oxidative stress caused by hyperglycemia [30]. In the current study, vascular impairment observed in the DAP associated with DM was not limited to the arterial wall. There was a decrease of 36% in the area of the CC sinuses, compared to control rabbits. This decrease in the sinus area can be explained by the increasing density of smooth muscle in the CC septa, thus enlarging the septal area [3].

In conclusion, experimentally induced DM by alloxan injection in rabbits resulting in 10 weeks of hyperglycemia, causes important changes in the vascular structures of the penis, promoting alterations in the tunica intima, media, and adventitia, as well as significant decreases in the area of the CC sinuses. These changes decrease the blood supply and affect the hemodynamics of the penis, thus leading to ED.

### **Acknowledgements**

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

**Conflict of interest statement** There is no conflict of interest.

## References

- 1) Lue TF, Tanagho EA (1987) Physiology of erection and pharmacological management of impotence. *J Urol* 137:829–836
- 2) Bastos AL, Costa WS, Sampaio FJB (2004) Concentration of elastic fibers in the male urethra during human fetal development. *BJU Int* 94:620–623
- 3) Abidu-Figueiredo M, Ribeiro IC, Chagas MA, Cardoso LEM, Costa WS, Sampaio FJB (2010) The penis in diabetes: Structural analysis of connective tissue and smooth muscle alterations in a rabbit model. *BJU Int* 108:400–404
- 4) Pinheiro ACAD, Costa WS, Cardoso LEM, Sampaio FJB (2000) Organization and relative content of smooth muscle cells and extracellular matrix components in the corpus cavernosum of the rat penis. *J Urol* 164:1802–1806
- 5) Bischoff E (2001) Rabbits as models for impotence research. *Int J Imp Res* 13:146–148
- 6) Papadoukakis S, Alamanis C, Mitropoulos D, Chountala, Giannopoulos A (2004) Morphologic findings and blood parameters of penile vasculature in patients with erectile dysfunction. *World J Urol* 22:285–288
- 7) Burke JP, Jacobson DJ, McGree ME, Nehra A, Roberts RO, Girman CJ, Lieber MM, Jacobsen SJ (2007) Diabetes and Sexual Dysfunction: Results From the Olmsted County Study of Urinary Symptoms and Health Status Among Men. *J Urol* 177:1438–1442
- 8) Zotova EG, Schaumburg HH, Raine CS, Cannella B, Tar M, Melman A, Arezzo JC (2008) Effects of hyperglycemia on rat cavernous nerve axons: A functional and ultrastructural study. *J Exp Neurol* 213:439–447
- 9) Chitale K (2009) Type 1 and type 2 diabetic-erectile dysfunction: Same diagnosis (ICD-9), different disease? *J Sex Med* 6:262–268
- 10) Vranes D, Cooper ME, Dilley J (1999) Cellular mechanisms of diabetic vascular hypertrophy. *Microvasc Res* 57:8–18
- 11) Jandeleit-Dahm K, Hannan KM, Farrelly CA, Allen TJ, Rumble JR, Gilbert RE, Cooper ME, Little PJ (2000) Diabetes-induced vascular hypertrophy is accompanied by activation of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange and prevented by Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibition. *Circ Res* 87:1133–1140
- 12) Peiró C, Ângulo J, Rodríguez-Mañas L, Llergo JL, Vallejo S, Cercas E, Sánchez-Ferrer CF (1998) Vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by glycosylated human oxyhaemoglobin. *Br J Pharmacol* 125:637–644
- 13) Maia RS, Babinski MA, Abidu-Figueiredo M, Chagas MA, Costa WS, Sampaio FJB (2006) Concentration of elastic system fibers in the corpus cavernosum, corpus spongiosum, and tunica albuginea in the rabbit penis. *Int J Impot Res* 18:121–125

- 14) Taub HC, Lerner SE, Melman A, Christ GJ (1993) Relationship between contraction and relaxation in human and rabbit corpus cavernosum. *Urology* 42: 698–704
- 15) Beresford WA and Burkart S (1977) The penile bone and anterior process of the rat in scanning electron microscopy. *J Anat* 124:589–597
- 16) Ozgel O, Dursun N, Cengelci A, e Ates S (2003) Arterial supply of the penis in the New Zealand Rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L). *Anat Histol Embryol* 32:6–8
- 17) Kovanecz I, Nolazco G, Ferrini MG, Toblli JE, Heydarkhan S, Vernet D, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF (2009) Early onset of fibrosis within the arterial media in a rat model of type 2 diabetes mellitus with erectile dysfunction. *BJU Int* 103:1396–1404
- 18) Bozkurt NB, Pekiner C (2006) Impairment of endothelium- and nerve-mediated relaxation responses in the cavernosal smooth muscle of experimentally diabetic rabbits: Role of weight loss and duration of diabetes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 373:71–78
- 19) Bancroft JD, Cook HC (1994) Connective tissues. In: *Manual Of Histological Techniques And Their Diagnostic Application*. 1st ed, Churchill Livingstone, Edinburgh, pp 42
- 20) Rizzoni D, Rosei EA (2009) Small artery remodeling in diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19:587–592
- 21) Wang CJ, Shen SY, Wu CC, Huang CH, Chiang CP (1993) Penile blood flow study in diabetic impotence. *Urol Int* 50:209–212
- 22) Alipui C, Ramos K, Tenner Jr TE (1993) Alterations of rabbit aortic smooth muscle cell proliferation in diabetes mellitus. *Cardiovasc Res* 27:1229–1232
- 23) Hadcock S, Richardson M, Winocour PD, Hatton MW (1991) Intimal alterations in rabbit aortas during the first 6 months of alloxan-induced diabetes. *Arterioscler Thromb* 11:517–529
- 24) Varu VN, Ahanchi SS, Hogg ME, Bhikhapurwala HA, Chen A, Popowich DA, Vavra AK, Martinez J, Jiang Q, Saavedra JE, Hrabie JA, Keefer LK, Kibbe MR (2010) Insulin enhances the effect of nitric oxide at inhibiting neointimal hyperplasia in a rat model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:772–779
- 25) Uvelius B (1986) Detrusor smooth muscle in rats with alloxan-induced diabetes. *J Urol* 136:949–952
- 26) Cester N, Rabini RA, Salvolini E, Staffolani R, Curatola A, Pugnali A, Brunelli MA, Biagini G, Mazzanti L (1996) Activation of endothelial cells during insulin-dependent diabetes mellitus: a biochemical and morphological study. *Eur J Clin Invest* 26:569–573

27) Robbins SL, Cotran RS, Kumar V (2000) Cellular injury and cellular death. In: Schoen FJ (ed) Pathological basis of disease, 6th ed, WB Saunders company, Philadelphia, pp 14

28) Little PJ, Allen TJ, Hashimura K, Nigro J, Farrelly CA, Dilley RJ (2003) High glucose potentiates mitogenic responses of cultured ovine coronary smooth muscle cells to platelet derived growth factor and transforming growth factor-beta1. *Diab Res Clin Pract* 59:93–101

29) Dilley RJ, Farrelly CA, Allen TJ, Jandeleit-Dahm K, Cooper ME, Morahan G, Little J (2005) Diabetes induces Na/H exchange activity and hypertrophy of rat mesenteric but not basilar arteries. *Diabetes Res Clin Pract* 70:201–208

30) Karasu Ç (2010) Glycooxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: Effects of antioxidant treatment. *Open Cardiovasc Med J* 4:240–256

## Figure legends

**Fig. 1** Tunica intima of the DAP of a diabetic rabbit, showing cytoplasmic vacuolization (arrows) and nuclear protrusions (arrow heads) in the endothelium. Sections were stained with PAS stain, and images were taken at 1000x magnification. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$

**Fig. 2** Immunostaining of the smooth muscle in the tunica media of the DAP of rabbits. **a** Control group. **b** Diabetic group. Sections were stained with the anti-alpha-actin antibody, and images were taken at 400x magnification. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$

**Fig. 3** Collagen arrangement in the tunica adventitia of the DAP of rabbits. **a** Control group. **b** Diabetic group. Sections were stained with Picro Sirius red stain, and images were taken using polarized light at 400x magnification. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$

**Fig. 4** Area of the CC sinuses of rabbits. **a** Control group. **b** Diabetic group. Binarized image taken at 40x magnification. Scale bar: 200  $\mu\text{m}$

**Table 1** Morphological measurements of the DAP in control and diabetic rabbits.Data are presented as mean  $\pm$  SD

Parameter	Control group	Diabetic group
DAP wall thickness	35.012 $\pm$ 3.177 $\mu\text{m}$	44.330 $\pm$ 8.434 $\mu\text{m}^*$
DAP area (túnica intima + tunica media)	12070.675 $\pm$ 2938.2 $\mu\text{m}^2$	18221.298 $\pm$ 6861.9 $\mu\text{m}^{2*}$
DAP nuclear density	0.007154 $\pm$ 0.001954 nuclei/ $\mu\text{m}^2$	0.004808 $\pm$ 0.002069 nuclei/ $\mu\text{m}^2$

\* *Statistically significant (p value < 0,05)*

**ANEXO – Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa**

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES  
COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/227/2008** sobre "*Análise estrutural do pênis de coelhos normais e diabéticos*", sob a responsabilidade de **Francisco José Barcellos Sampaio**, 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 (CEA), em **04/04/2008**. Este certificado expira em **04/04/2010**.

Rio de Janeiro, 04 de abril de 2008.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Antonio Carlos da Silva".

---

Prof. Antonio Carlos da Silva  
Coordenador – CEA/IBRAG/UERJ