



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

Sabrina Barbosa Rebello Lessa Ribeiro

**Análise estereológica e bioquímica do tecido conjuntivo e muscular  
no corpo cavernoso adjacente à placa fibrosa da doença de  
Peyronie**

Rio de Janeiro

2008

Sabrina Barbosa Rebello Lessa Ribeiro

**Análise estereológica e bioquímica do tecido conjuntivo e muscular no corpo cavernoso adjacente à placa fibrosa da doença de Peyronie**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Morfologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa.

Coorientador: Prof.Dr. Francisco Jose Barcelos Sampaio

Rio de Janeiro

2008

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

R484 Ribeiro, Sabrina Barbosa Rebello Lessa

Análise estereológica e bioquímica do tecido conjuntivo e muscular no corpo cavernoso adjacente à placa fibrosa da doença de Peyronie / Sabrina Barbosa Rebello Lessa Ribeiro. – 2008.  
47 f.

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa.  
Coorientador: Prof.Dr. Francisco Jose Barcelos Sampaio

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Morfologia.

1. Pênis – Patologia – Teses. 2. Induração peniana. 3. Histoquímicas-Tese. 4. Imunohistoquímica – Teses. 5. Tecido conjuntivo – Teses. 6. Colágeno - Teses. I. Costa, Waldemar Silva. II. Sampaio, Francisco Jose Barcelos Sampaio. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 611.641

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

---

Assinatura

---

Data

Sabrina Barbosa Rebello Lessa Ribeiro

**Análise estereológica e bioquímica do tecido conjuntivo e muscular no corpo cavernoso adjacente à placa fibrosa da doença de Peyronie**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Morfologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2008.

Banca Examinadora:

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro

2008

## DEDICATÓRIA

Ao meu marido DENNIS pelo amor, apoio e compreensão pelos momentos de ausência em função deste trabalho e por sempre estar ao meu lado, aos meus pais GERALDO e VERA pelo apoio irrestrito durante toda a minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor FRANCISCO JOSÉ BARCELOS SAMPAIO pela orientação, pelo exemplo, competência e dedicação à pesquisa.

Ao professor WALDEMAR SILVA COSTA pela lição de vida acadêmica, amizade e auxílio na elaboração deste trabalho.

Ao professor LUIZ EDUARDO DE MACEDO CARDOSO pela orientação e supervisão da parte bioquímica realizada em seu laboratório assim como pelas correções e sugestões feitas durante a tradução do manuscrito.

À professora CARLA GALLO pelo apoio e ajuda na confecção dos esquemas e fotos apresentados neste trabalho.

Ao Professor MÁRCIO ANTÔNIO BABINSKI, pela amizade e por ter sido o primeiro a tornar possível esse trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório pela ajuda e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

RIBEIRO, Sabrina Barbosa Rebello Lessa. **Análise estereológica e bioquímica do tecido conjuntivo e muscular no corpo cavernoso adjacente à placa fibrosa da doença de Peyronie**. 47 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Morfologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Os estudos sobre a doença de Peyronie geralmente estão centrados em análises da placa fibrosa que se forma na túnica albugínea. Devido a esta reação fibrótica mediada por vários fatores solúveis inflamatórios o tecido conjuntivo adjacente também pode ser afetado. Este efeito secundário pode, por exemplo, explicar a disfunção erétil que ocorre na doença. Foram obtidas biopsias do corpo cavernoso adjacente a placa fibrótica e parte da própria placa de 7 pacientes com a doença de Peyronie (média de idade 48.3 anos). As amostras do grupo controle foram obtidas de forma semelhante durante a autopsia de 5 indivíduos (média de idade 52,3 anos). O material foi submetido a técnicas histoquímicas: H&E, Van Gieson, técnicas imunohistoquímicas: Anti-alfa actina, Anti-elastina e métodos bioquímicos para a dosagem do colágeno total. A quantificação foi feita através de métodos estereológicos. No corpo cavernoso foi observada uma redução estatisticamente significativa de fibras do sistema elástico de pacientes com a doença de Peyronie ( $19,49\% \pm 3,27\%$  vs  $23,56\% \pm 1,87\%$ ;  $p < 0,05$ ). O colágeno e o músculo liso não apresentaram variação quantitativa quando comparado ao grupo controle. No músculo liso ( $34,46\% \pm 2,06\%$  vs  $38,38\% \pm 3,17\%$ ) e tecido conjuntivo ( $35,39\% \pm 6,15\%$  vs  $38,02\% \pm 5,03\%$ ). A densidade volumétrica das fibras do sistema elástico na placa fibrótica foi diminuída em 38,3% comparada a túnica albugínea normal ( $20,25\% \pm 5,49\%$  vs  $32,81\% \pm 4,75\%$ ;  $p < 0,02$ ) e a concentração de colágeno no corpo cavernoso do grupo controle ( $77,94 \pm 24,26 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) e doença de Peyronie ( $66,57 \pm 19,39 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) não diferem significativamente. Os cortes corados com Vermelho de Picrosírius revelaram que no corpo cavernoso normal cores associadas ao colágeno encontravam-se homogeneamente distribuídas. Na doença de Peyronie o colágeno apresentava uma desorientação. A análise quantitativa indicou que o colágeno do corpo cavernoso adjacente à placa fibrótica não estava afetado, embora sua organização estivesse notoriamente alterada. As fibras do sistema elástico do corpo cavernoso estavam reduzidas e uma modificação similar foi encontrada na placa fibrótica da túnica albugínea. Estes resultados sugerem que, embora ocorram primariamente na túnica albugínea, a placa fibrótica da doença de Peyronie pode induzir mudanças no corpo cavernoso adjacente.

Palavras-chaves: Doença de Peyronie. Histoquímica. Imunohistoquímica

## ABSTRACT

RIBEIRO, Sabrina Barbosa Rebello Lessa. **Stereological analysis and biochemistry of muscle tissue and adjacent to the corpus cavernosum fibrous plaque of Peyronie's disease.** 47 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Morfologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Studies on Peyronie disease (PD) usually focus the analysis on the fibrous plaque that forms in the tunica albuginea (TA). Because this fibrotic reaction is mediated by various inflammatory soluble factors adjacent connective tissues might also be affected. This secondary effect might explain, for example, the erectile dysfunction that occurs in this disease. We thus investigated the structural organization of the connective tissue in the corpus cavernosum (CC) adjacent to the fibrous plaque using stereological and biochemical techniques: During surgery of 7 PD patients (mean age 48.3 years), biopsies were obtained from the CC adjacent to the fibrous plaque and from the plaque itself. All patients had normal erection. Controls were similarly located samples from normal penises obtained during autopsy of 5 individuals (mean age 52.3 years). Tissue samples were stained with Weigert's stain (elastic fibers), Van Gieson's stain (connective tissue), and Sirius red (collagen). Stereological analysis was done using a 42-point grid to determine volumetric densities (Vv). Total collagen content was estimated as  $\mu\text{g}$  hydroxyproline per mg dry CC. Vv of elastic fibers was significantly reduced by 17.3% in PD compared with controls ( $19.49\% \pm 3.27\%$  vs  $23.56\% \pm 1.87\%$ ;  $p < 0.05$ ), while SMC ( $34.46\% \pm 2.06\%$ ) and connective tissue ( $35.39\% \pm 6.15\%$ ) Vv in this disease were not significantly different from those of controls ( $38.38\% \pm 3.17\%$  and  $38.02\% \pm 5.03\%$ , respectively). Vv of elastic fibers in the fibrous plaque was decreased by 38.3% compared with the normal TA ( $20.25\% \pm 5.49\%$  vs  $32.81\% \pm 4.75\%$ ;  $p < 0.02$ ), and collagen concentration in the CC from controls ( $77.94 \pm 24.26 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) and PD ( $66.57 \pm 19.39 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) did not differ significantly. Sirius red-stained sections under polarized light revealed that, in the normal CC, collagen-associated colors were homogeneously distributed. In PD, stained collagen had a disrupted orientation and had a more heterogeneous birefringence, which imply looser collagen bundles. The quantitative analyses indicated that collagen in the CC close to the fibrous plaque was not affected, although its organization was noticeably altered. Cavernosal elastic fibers were reduced though, and a similar change was found in the fibrous plaque of the TA. These results suggest that, although occurring primarily in the TA, the PD fibrous plaque may induce changes in the adjacent CC.

Keywords: Peyronie Disease. Histochemistry. Immunohistochemistry



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Aspectos anatômicos do pênis humano normal .....	12
Figura 2 -	Corte transversal do pênis na doença de Peyronie .....	15
Figura 3 -	Sistema-teste M42 .....	23
Figura 4 -	Densidade volumétrica de fibras do sistema elástico (A), músculo liso (B), e tecido conjuntivo (C) no corpo cavernoso adjacente a túnica albugínea de 5 indivíduos normais (controle) e da placa fibrosa de 7 casos de pacientes com a doença de Peyronie .....	25
Figura 5 -	Densidade volumétrica de fibras do sistema elástico na túnica albugínea de 5 indivíduos normais (controle) e placa fibrosa de 7 casos com a doença de Peyronie .....	27
Figura 6 -	Concentração do colágeno total no corpo cavernoso adjacente a túnica albugínea de 5 indivíduos normais (controle) e da placa fibrosa de 7 pacientes com a doença de Peyronie .....	28
Figura 7 -	Fotomicrografia I .....	28
Figura 8 -	Fotomicrografia II.....	28
Figura 9 -	Fotomicrografia III.....	29
Figura 10 -	Fotomicrografia IV.....	29
Figura 11 -	Fotomicrografia V.....	29
Figura 12 -	Fotomicrografia VI.....	30

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
1.1	<b>Morfologia do pênis</b> .....	11
1.2	<b>Músculo liso</b> .....	11
1.3	<b>Colágeno</b> .....	12
1.4	<b>Sistema elástico</b> .....	13
1.5	<b>Doença de Peyronie</b> .....	13
1.5.1	<u>Epidemiologia</u> .....	15
1.5.2	<u>Etiologia</u> .....	15
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	17
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
3.1	<b>Obtenção de Amostra</b> .....	18
3.2	<b>Processamento histológico e coloração</b> .....	20
3.2.1	<u>Histoquímica</u> .....	20
3.2.2	<u>Imunohistoquímica</u> .....	20
3.3	<b>Aquisição de imagens</b> .....	21
3.4	<b>Esterologia</b> .....	21
3.5	<b>Preparação do tecido nervoso para análise histoquímica</b> .....	23
3.6	<b>Concentração de colágeno total</b> .....	24
3.7	<b>Estatística</b> .....	24
4	<b>RESULTADOS</b> .....	25
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	30
5.1	<b>Colágeno</b> .....	31
5.2	<b>Sistema elástico</b> .....	32
5.3	<b>Fibras musculares</b> .....	33
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	34
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
	<b>ANEXO A - Resumo aceito para apresentação na American Urological Association (AUA). Annual Meeting 17-22 may 2008 Orlando Florida, USA</b> .....	39

<b>ANEXO B</b> - Artigo submetido e aceito no British Journal of Urology International .....	41
---	----

## INTRODUÇÃO

A doença de Peyronie é supostamente uma alteração localizada do tecido conjuntivo da túnica albugínea que envolve os corpos cavernosos do pênis humano. É caracterizada pela formação de nódulos ou placas fibróticas. Essas placas fibróticas levam às deformidades peculiares que são mais evidentes durante a ereção. Os estudos sobre a doença de Peyronie geralmente estão centrados em análises da placa fibrosa que se forma na túnica albugínea. A etiologia da doença de Peyronie ainda é desconhecida. A maioria dos estudos mostrou que o trauma durante a penetração é considerado como o estímulo que inicia o processo de fibrose, associado a uma pré-disposição genética. Devido a esta reação fibrótica mediada por vários fatores solúveis inflamatórios o tecido conjuntivo adjacente também pode ser afetado. Este efeito secundário pode, por exemplo, explicar a disfunção erétil que ocorre na doença. O objetivo do presente trabalho é verificar se a doença de Peyronie se restringe somente a túnica albugínea ou envolve outras estruturas penianas. Estas Observações permitiriam correlacionar Doença de Peyronie e disfunção erétil.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Morfologia do pênis

O tecido erétil peniano é composto por dois corpos cavernosos situados dorsalmente e um corpo esponjoso situado ventralmente, no interior do qual se situa a uretra. Cada corpo cavernoso é envolvido por uma camada de tecido fibroso, chamada de túnica albugínea e uma fascia única denominada fascia de Buck, localizada superficialmente à túnica albugínea envolvendo todos os três corpos (DRAKE et al., 2005).

A túnica albugínea é bilaminar em quase toda a sua circunferência. É composta por uma camada longitudinal externa e uma camada circular interna. A túnica albugínea varia em espessura de 1.5mm a 3mm dependendo do local. A camada externa longitudinal é ausente na parte ventral mediana. Neste local a túnica se apresenta com uma única camada. Na parte ventral adjacente ao corpo esponjoso e na parte dorsal a camada externa longitudinal é mais espessa. Na região lateral é mais fina Fig. 1 (WALSH et al., 2002).

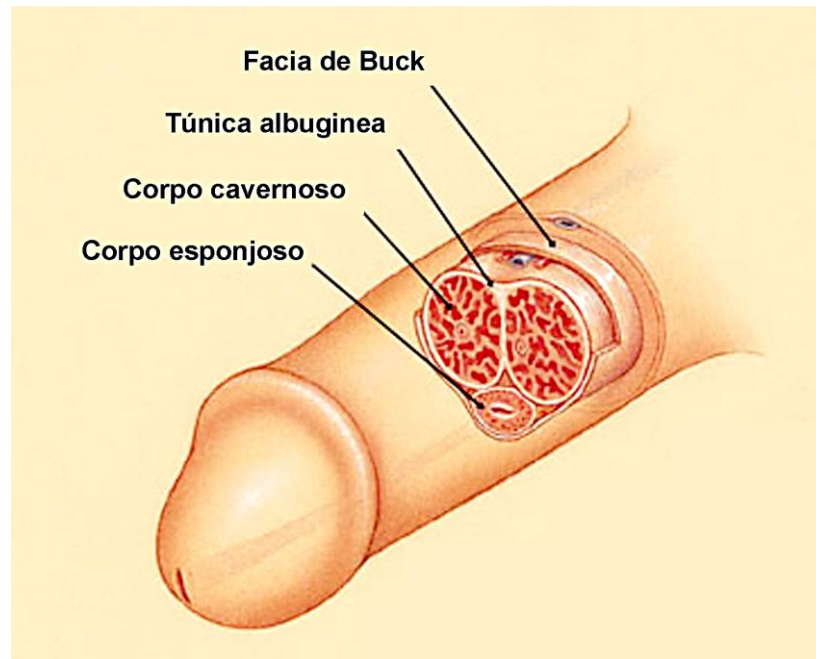
Os corpos cavernosos são as principais estruturas do pênis envolvidas na ereção. Eles são separados por um septo incompleto. O corpo cavernoso é composto de músculo liso, fibroblastos, matriz extracelular, vasos sanguíneos e nervos (IACONO et al., 1994).

### 1.2 Músculo liso

O papel do músculo liso no corpo cavernoso é a manutenção da ereção, criando uma elevação da pressão intra-cavernosa durante a ereção a qual não pode ser obtida apenas por mecanismos vasculares (GOLDSTEIN et al., 1982). A célula muscular lisa é o principal componente do corpo cavernoso de contração-relaxamento. Para se alcançar tumescência e manter a rigidez peniana, é preciso

uma determinada percentagem de células musculares lisas (WESPES et al., 1991) (Figura 1)

Figura 1 – Aspectos anatômicos do pênis humano normal



Fonte: JUNQUEIRA ,2004.

### 1.3 Colágeno

O colágeno é a proteína fibrosa mais abundante no reino animal, representando cerca de 1/3 do total das proteínas encontradas nos tecidos e resistentes a tensão (VAN DER REST, GARRONE, 1991). É constituído por três cadeias protéicas longas organizadas em  $\alpha$ -hélice. A estrutura primária das cadeias é formada por uma seqüência de três aminoácidos: Gly-X-Y (domínios colagênicos), que se repete por grandes extensões. Uma característica do colágeno é sua composição de aminoácidos, dos quais 30% correspondem a glicina. Os aminoácidos colocados nas posições x e y são frequentemente prolina e hidroxiprolina, respectivamente. Cada cadeia de colágeno tem suas próprias características quanto à composição de aminoácidos, que são utilizados para identificar o tipo de colágeno.

Os colágenos são secretados sob a forma de precursores, os procolágenos. Numerosas modificações pós-tradução podem ocorrer, tais como hidroxilação dos resíduos de prolina, ligações cruzadas, glicosilação e remoção dos peptídeos de registro, para dar origem às moléculas de tropocolágeno. Essas moléculas apresentam uma grande tendência a se polimerizarem de uma forma ordenada originando as fibras de colágeno. Embora mantendo sua individualidade as fibrilas de colágeno podem se organizar lateralmente formando fibras e estas organizarem-se em estrutura de maior espessura denominada feixes de colágeno (KADLER et al., 1996).

Diferentes tipos de colágeno estão envolvidos direta e indiretamente na interação e diferenciação celular e também podem agir com agentes quimiotáticos e como antígenos em processos imunológicos.

#### 1.4 Sistema elástico

No tecido conjuntivo, as fibras do sistema elástico distinguem-se facilmente das colágenas por serem mais delgadas e não apresentarem estriação transversal. Essas fibras cedem facilmente mesmo às trações mínimas, porém retomam sua forma inicial tão logo cessem as forças deformantes (JUNQUEIRA, 2004).

As fibras do sistema elástico apresentam uma cor amarelada quando observadas a fresco e são caracterizadas pelo alto grau de extensibilidade que apresentam. São encontradas em tecidos que estão constantemente submetidos a grandes forças de estiramento (COTTA-PEREIRA, 1984).

A fibra elástica é uma estrutura complexa formada por elastina, proteína microfibrilar, lisiloxidase, e proteoglicanos (MECHAM, 1991).

Sabe-se que, durante o processo de desenvolvimento de uma fibra elástica, o componente microfibrilar é o primeiro que aparece, vindo depois a ser depositada a elastina, provavelmente devido a uma interação iônica entre a elastina e a superfície microfibrilar como consequência de suas cargas opostas (ROSS; BORNSTEIN, 1969).

De acordo com o grau de associação entre esses componentes as fibras do sistema elástico são divididas em 3 tipos:

- 1- Fibras elásticas: constituídas em sua maior parte de elastina (em posição central) e um número reduzido de microfibrilas em posição periférica (ROSS; BORNSTEIN, 1969).
- 2- Fibras elaunínicas: com pouca elastina e grande número de microfibrilas organizadas em feixes
- 3- Fibras oxitalânicas: compostas somente por microfibrilas.

### **1.5 A doença de Peyronie.**

A doença de Peyronie é supostamente uma alteração localizada do tecido conjuntivo da túnica albugínea que envolve os corpos cavernosos do pênis humano. É caracterizada pela formação de nódulos ou placas fibróticas. Essas placas fibróticas levam a deformidades peculiares que são mais evidentes durante a ereção Fig. 1C (SMITH et al., 2005). A placa fibrótica geralmente está localizada na superfície dorsal do órgão. Podem ocorrer também deformidades laterais, ventrais ou em ampulheta, sendo esta mais rara e resultando em uma maior dificuldade para penetração (GHOLAMI et al., 2003). A doença de Peyronie ocorre mais freqüentemente em homens adultos com idade entre 52 a 80 anos (SMITH et al., 2005; KENDIRCI et al., 2007).

Inicialmente ocorre um infiltrado celular inflamatório perivascular na túnica albugínea que culmina com a formação de uma placa fibrótica de tecido cicatricial (SOMERS; DAWSON, 1997). Esta placa fibrótica causa uma desorganização do colágeno e das fibras elásticas da túnica albugínea e conseqüentemente afeta sua extensibilidade e complacência levando a deformidade peniana (DEVINE et al., 1997) (AKKUS et al., 1997).

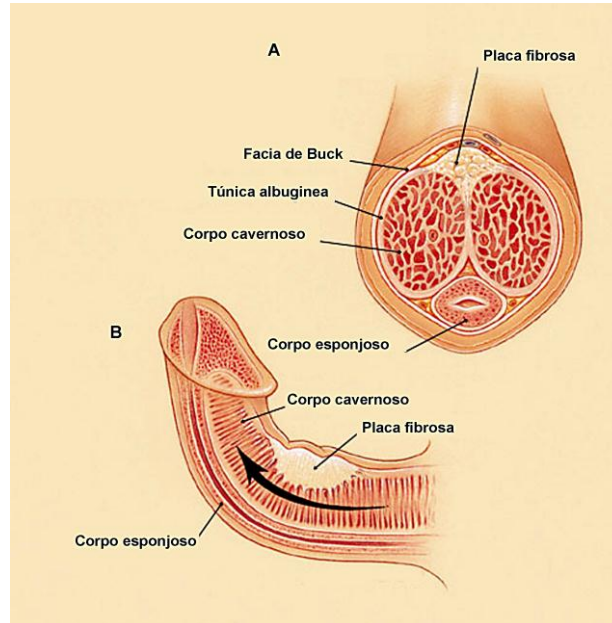
Recentemente, (KENDIRCI et al., 2007) descreveu a influência da diabete mellitus sobre a curvatura peniana. Demonstrou uma severidade da curvatura peniana nesses indivíduos, quando comparado aos que não apresentavam outros fatores de risco.

No início da doença, a maioria dos pacientes com doença de Peyronie não apresentam dificuldades para ter ou manter a ereção. Entretanto, com o passar do



tempo eles apresentam dificuldade para a penetração devido, não somente a deformidade, como também a dor (Figura 2).

Figura 2 – Corte transversal do pênis na doença de Peyronie



Legenda: Corte transversal do pênis na doença de Peyronie mostrando a placa fibrosa dorsal (A) e vista lateral do pênis de indivíduo com a doença de Peyronie (B).  
Fonte: JUNQUEIRA, 2004

### 1.5.1 Epidemiologia

Estudos anteriores mostraram que a prevalência da doença de Peyronie varia entre 0.4% a 3.5% em homens adultos no mundo inteiro. Embora essa doença, no passado, tenha sido considerada como rara, estudos epidemiológicos mostraram que a incidência é muito maior do que se pensava (SCHWARZER et al., 2001). A incidência real da doença pode, de fato, ser mais elevada devido a falta de informação dos pacientes e diagnósticos errados. Muitos médicos concordam que a prevalência da doença aumentou depois do aparecimento de drogas para tratamento de disfunção erétil (SMITH et al., 2005).

### 1.5.2 Etiologia

A etiologia da doença de Peyronie ainda é desconhecida. A maioria dos estudos mostrou que o trauma durante a penetração é considerado como o estímulo que dá início ao processo de fibrose, associado a uma pré-disposição genética (GHOLAMI et al., 2003). A ruptura de vasos na túnica albugínea leva ao extravasamento de sangue e ao início de um processo de cicatrização não funcional com formação de tecido fibrótico (SOMERS; DAWSON, 1997).

Estudos histológicos recentes revelaram que na túnica albugínea há um aumento da expressão do fator de crescimento TGF- $\beta$  1, importante mediador nos processos inflamatórios nas placas dos pacientes portadores da doença de Peyronie (EL SAKKA et al., 1997; EL SAKKA et al., 1998), (GHOLAMI et al., 2003; HAAG et al., 2007). O TGF- $\beta$  é sintetizado como um peptídeo latente por muitas células, tais como plaquetas, macrófagos e fibroblastos. Quando ativado o TGF- $\beta$  se liga aos receptores da superfície celular e geralmente resulta em síntese de tecido conjuntivo e provoca inibição das colagenases (EL SAKKA et al., 1997; EL SAKKA et al., 1998).

Foi proposto que, sendo a túnica albugínea de natureza avascular, ela impede a remoção (clearance) desses fatores de crescimento. Como consequência ocorre um acúmulo desses fatores, o que contribui para uma cicatrização desordenada e a formação das placas na túnica albugínea. Essas placas irão impedir a expansão dos tecidos do corpo cavernoso durante a ereção (WALSH et al., 2002).

Outras hipóteses são a falha na remoção (clearance) de fibrina, alterações no colágeno e perda da elasticidade tecidual como um processo normal da idade, induzindo um stress na túnica (SMITH et al., 2005).

Associam-se também a doença de Peyronie a contratura palmar de Dupuytren (15% a 25%), fibrose auricular, fibromatose plantar e esclerodermia, sugerindo uma doença auto-imune (DEVINE et al., 1997).

Disfunção erétil e doença de Peyronie têm sido comumente associadas apesar dessa relação não estar totalmente esclarecida (EL SAKKA, 2006), (SCHWARZER et al., 2001), (KADIOGLU et al., 2004). Nos trabalhos relativos à doença de Peyronie não foram encontradas referências indicando que a doença possa afetar também outros componentes do pênis, trazendo como consequência

problemas de disfunção erétil. Como a ereção está diretamente ligada ao corpo cavernoso uma análise dos componentes desta estrutura, especialmente fibras musculares lisas e elementos fibrosos da matriz extracelular (fibras elásticas e colágeno) podem mostrar modificações e indicar que estas alterações ocorrem concomitantemente àquelas observadas na túnica albugínea. Uma análise desses elementos poderia, portanto contribuir para elucidar se realmente existe uma correlação entre doença de Peyronie e disfunção erétil.

## 2 OBJETIVO

Objetivo Geral: O objetivo do presente trabalho é verificar se a doença de Peyronie se restringe somente a túnica albugínea ou envolve outras estruturas penianas. Estas Observações permitiriam correlacionar Doença de Peyronie e disfunção erétil.

Objetivo específico: O objetivo do presente trabalho é analisar o corpo cavernoso do pênis, adjacente a túnica albugínea lesada (placa) e verificar, através de métodos quantitativos, que elementos da matriz extracelular (colágeno e fibras elásticas) e músculo liso, seriam afetados na doença de Peyronie.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção da amostra

Foram obtidas biopsias da túnica albugínea e do corpo cavernoso adjacente a área da placa (túnica lesada pelo processo fibrótico) em 7 pacientes com diagnóstico de doença de Peyronie, submetidos a tratamento cirúrgico.

O critério para indicação cirúrgica neste grupo de doentes foi a presença de curvatura peniana superior a 45 graus associada a significativo impacto na qualidade da penetração vaginal durante o ato sexual e um período mínimo de 6 meses com estabilidade da curvatura.

A idade dos pacientes variou de 40 a 68 anos (média de idade 48,3 anos). Durante a avaliação pré-operatória, todos os pacientes referiam ereções espontâneas sem a necessidade do uso de medicações orais, testes de ereção fármaco induzida com prostaglandina foram realizados em todos os pacientes para a avaliação do grau de curvatura e rigidez peniana (satisfatória em todos os pacientes após a administração de 10 mg). A técnica cirúrgica empregada foi a incisão em H da placa associado ao uso de enxerto de crura penina (Brant et al., 2006).

Foram obtidos 5 fragmentos do pênis de cadáveres (grupo controle), cuja causa mortis não estava relacionada ao sistema urogenital (40-66 anos - idade média 52.3 anos).

Os fragmentos da túnica albugínea e do corpo cavernoso do pênis sofreram a clivagem “ortrip” para a realização da estereologia. Esse método consiste em seccionar o fragmento três vezes consecutivamente, sendo o primeiro corte aleatório, o segundo ortogonal ao primeiro e o terceiro também ortogonal ao segundo. Desta forma, obtêm-se cortes aleatórios uniformemente isotrópicos (LACERDA, 1998).

## 3.2 Processamento histológico e Coloração

### 3.2.1 Histoquímica

Cada amostra foi fixada em formalina tamponada a 10%. Os espécimes foram processados para inclusão em parafina.

Os cortes de 5µm de espessura foram corados inicialmente com H&E para verificar a integridade do material.

Para evidenciar as fibras do sistema elástico foi utilizada a coloração da Fucsina - Resorcina de Weigert com prévia oxidação com oxona. O reativo de Weigert é formado pela precipitação da fucsina básica-resorcina pelo cloreto de ferro demonstrando a presença de fibras elásticas e elaulínicas e após uma etapa de oxidação com ácido peracético/oxona, também as fibras oxitalânicas. Um tratamento inicial com uma solução de permanganato de potássio acidificada em ácido oxálico promove um clareamento de fundo (BANCROFT; COOK, 1994), resultando as fibras elásticas coradas em violeta-escuro. Van Gieson para a caracterização do tecido conjuntivo e fibras musculares lisas; Vermelho de Picrosirius observado em microscópio de polarização para a evidenciação de possíveis diferenças na organização do colágeno.

### 3.2.2 Imunohistoquímica

A especificidade da coloração para músculo liso foi confirmada por meio de imunohistoquímica utilizando-se o anti-corpo anti  $\alpha$  actina (Zymed<sup>®</sup> Laboratories 08-0106 predilute antibody). A especificidade da coloração para o sistema elástico foi confirmada por meio de imunohistoquímica utilizando-se o anticorpo anti- elastina (monoclonal, E 4013 Sigma Saint Louis, MO, USA).

Os cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em uma série decrescente de álcool etílico até água, e lavados em tampão fosfato tamponado por 5 minutos. As lâminas foram encubadas em PBS 1% na estufa a 37 ° C, durante 5

minutos e posteriormente tripsinizadas na estufa 37° C, durante 30 minutos como procedimento para recuperação antigênica. Em seguida foram lavadas em PBS 1%, por 5 minutos e colocadas em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% em metanol por 10 minutos. Lavar em PBS. Incubar com anti-soro primário a 4 ° C “overnight”.

Os cortes foram lavados em PBS e incubados com anti-soro secundário biotinilado. Lavados novamente em PBS 1% após adicionado o cromógeno DAB lavados em água corrente, desidratados, clarificados e montados.

### **3.3 Aquisição das Imagens**

Foram analisados 10 cortes de cada uma das amostras e contados 10 campos aleatórios por corte totalizando 100 campos por indivíduo (corpo cavernoso e túnica albugínea) para cada um dos métodos de coloração utilizado.

Os campos foram obtidos usando-se uma videocâmara acoplada ao microscópio de luz Olympus, com um aumento de 200X. As imagens foram convertidas em sinais digitais e foram transferidos ao computador. Os dados foram obtidos pelo método de contagem de pontos, superpondo-se um sistema teste M-42 (WEIBEL et al., 1966) sobre a tela do monitor de vídeo.

### **3.4 Estereologia**

Através de métodos estereológicos foram analisados 10 cortes de cada uma das amostras e contados 10 campos por corte totalizando 100 campos por indivíduo (corpo cavernoso e túnica albugínea) para cada um dos métodos de coloração utilizado.

A Estereologia é uma metodologia atual que permite o conhecimento tridimensional de um órgão, tecido ou certa estrutura através da determinação de parâmetros quantitativos (quantificação) em imagens bidimensionais. Para isso

utiliza-se de princípios geométricos, matemáticos, estatísticos, e principalmente de bom senso (LACERDA, 1995, 1998), (ORIVE; WEIBEL, 1990).

Dois conceitos são básicos na Estereologia: o princípio de Delesse e o princípio de Cavalieri.

Segundo o princípio de Delesse a mensuração de uma área transversal relativa de objetos em relação à área total da estrutura, denominada de densidade de área ( $A_A$ ), dá uma estimativa sem viés do volume desses objetos. Esse estimador é chamado de densidade de volume ( $V_V$ ). Ou seja, o princípio de Delesse consiste em aceitar que a relação entre parâmetros parciais e absolutos é similar.

Segundo o princípio de Cavalieri, a partir de cortes seriados de uma certa estrutura podemos conhecer o seu volume, sendo para tal imprescindível conhecer a espessura da microtomia, porém não sendo necessário que todos os cortes da série sejam analisados. Podemos contar um corte a cada intervalo sistemático sem que isso, estatisticamente, diminua a acurácia do método. O trabalho de contagem assim fica reduzido e mais rápido Mandarim (LACERDA, 1995, 1998) (ORIVE; WEIBEL 1990).

A aquisição de dados na maioria dos estudos estereológicos é obtida diretamente de imagens, normalmente oriunda de microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão (LACERDA, 1995, 1998), (ORIVE; WEIBEL, 1990).

De acordo com Royet (1991), um dos primeiros autores a descrever um método para estimar a densidade de volume com a ajuda de um conjunto de pontos-teste. Esse método é chamado de “método de contagem de pontos” no qual  $P_P$  é a razão entre o número de pontos-teste que tocam a superfície do objeto e o número de pontos que tocam a superfície da estrutura. Sendo assim:

$$e \quad A_A = V_V = P_P$$

onde  $P_P$  = pontos-teste que tocam o objeto (pontos parciais) e  $P_T$  = pontos-teste que tocam a estrutura (pontos totais) (ROYET, 1991).

Na estereologia os resultados são obtidos através da contagem de pontos-teste e interseções-teste aplicando-se algumas fórmulas matemáticas definidas previamente considerando-se a geometria da construção do sistema-teste.

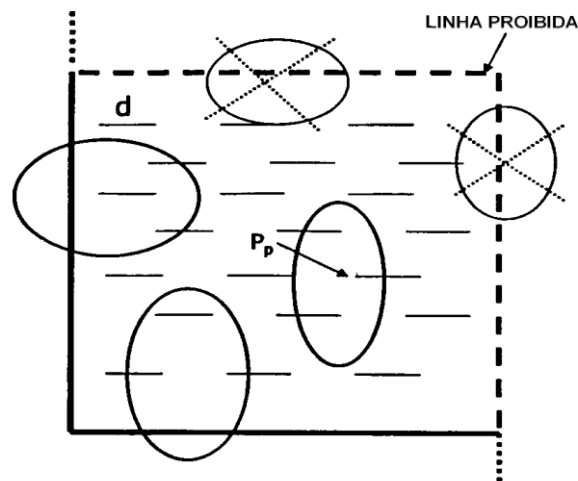
Um sistema teste é um sistema de linhas (retas ou curvas) e pontos que pode ser superposto a uma imagem morfológica para a contagem estereológica



(LACERDA, 1995, 1998). Tradicionalmente, os sistemas-teste são desenhados com linhas retas ou segmentos de linhas retas, apresentando um arranjo triangular, quadrangular ou hexagonal. Cada um desses arranjos determina as características básicas do sistema-teste.

Todas as estruturas estudadas que tocam as linhas proibidas do sistema-teste M42 não são contadas para não haver uma superestimação na quantificação.

Figura 3 - Sistema-teste M42.



Legenda: As estruturas que tocam as linhas proibidas (tracejadas) não são contadas. As linhas curtas (d) calibram esse sistema-teste e suas extremidades são considerados os pontos-teste (P<sub>p</sub>)

Fonte: MANDARIM DE LACERDA, 1995.

### 3.5 Preparação do tecido cavernoso para análise bioquímica

Imediatamente após a retirada durante a cirurgia ou autopsia as amostras do tecido cavernoso foram fixadas em acetona e mantidas no fixador por 24 horas a 4<sup>o</sup>C. As amostras foram então cortadas em fragmentos finos e submetidas a duas trocas de 24 horas cada em 40 mml de clorofórmio : metanol ( 2:1,v/v) a temperatura

ambiente. O solvente foi então decantado, e após encubação a 60<sup>o</sup> C por 30 minutos foi obtida e pesada uma amostra de tecido cavernoso seco e delipidado.

### **3.6 Concentração do colágeno total**

A concentração do colágeno total no tecido cavernoso foi determinada pela dosagem colorimétrica de hidroxiprolina. Dessa forma de 5 a 14 mmg de tecido cavernoso seco e delipidado foi hidrolisado em 6 N HCl por 18 horas a 118<sup>o</sup>C como previamente descrito (CABRAL et al., 2003). A dosagem foi então realizada (BERGMAN e LOXLEY, 1970) nos hidrolisados neutralizados usando o método da cloramina T. Os resultados foram expressos em µg de hidroxiprolina por mmg de tecido seco e delipidado.

### **3.7 Estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando os testes de (SOKAL RR., 1995). Comparações entre parâmetros estereológicos e bioquímicos entre controle e pacientes com Peyronie foram obtidos através do teste bicaudal de Wilcoxon. Todos os resultados foram dados em media ± seus desvios-padrões, e a significância estatística foi considerada com  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

Quantificações estereológicas do corpo cavernoso mostraram que a densidade volumétrica das fibras do sistema elástico foi significativamente reduzidas para 17,3% na doença de Peyronie comparado ao grupo controle ( $19,49\% \pm 3,27\%$  vs  $23,56\% \pm 1,87\%$ ;  $p < 0,05$ ) (Figuras 4 A, 7, 8). A densidade volumétrica do músculo liso ( $34,38\% \pm 2,06\%$ ) e tecido conjuntivo ( $35,39\% \pm 6,15\%$ ) nessa doença não apresenta diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $38,38\% \pm 3,17\%$  e  $38,02\% \pm 5,03\%$ , respectivamente) (Figuras. 4B, 4C, 9 e 10).

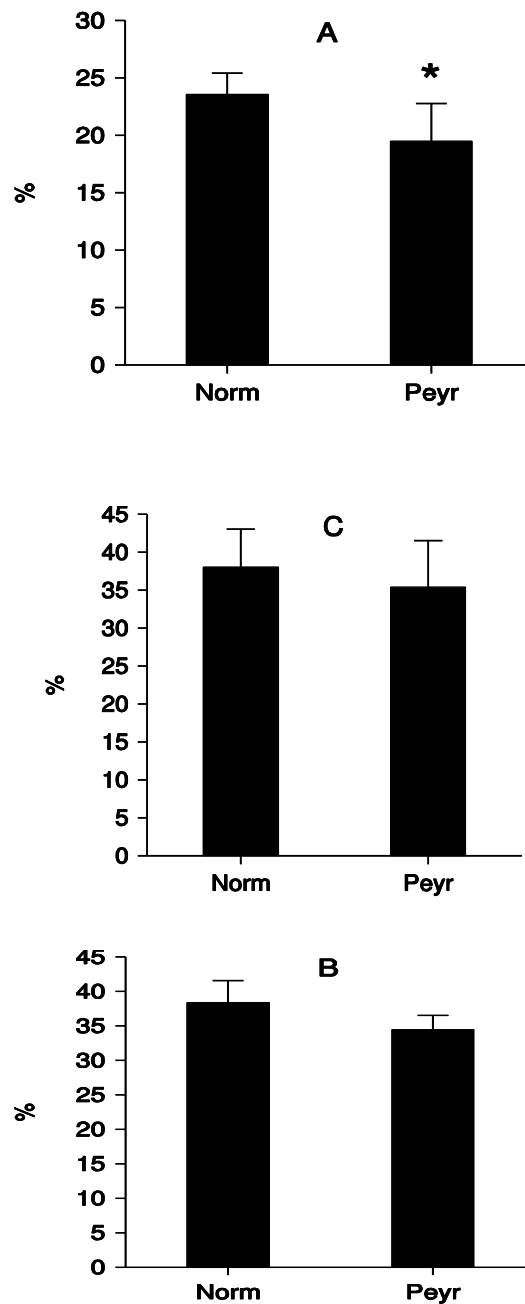
Para investigar se o tecido peniano primariamente afetado pela doença de Peyronie foi alterado determinou-se também de forma semelhante o conteúdo relativo de fibras elásticas na túnica albugínea. Como no corpo cavernoso, a densidade volumétrica das fibras elásticas na placa fibrosa de Peyronie diminuiu de 38,3% quando comparado com a túnica albugínea normal ( $20,25\% \pm 5,49\%$  contra  $32,81\% \pm 4,75\%$ ;  $p < 0,02$ ) (Figuras 5, 11,12).

Resultados estereológicos relativos à quantidade de tecido conjuntivo no corpo cavernoso foram posteriormente confirmados por determinação bioquímica da concentração total de colágeno. Os resultados mostraram que a concentração no tecido cavernoso dos controles ( $77,94 \pm 24,26 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) e doença de Peyronie ( $66,57 \pm 19,39 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) não diferem significativamente (Figura 6).

As análises quantitativas indicaram que o colágeno do tecido cavernoso junto à placa fibrótica não foi modificado em pacientes com a doença de Peyronie. Todavia, preparações histológicas usando o vermelho de PicroSirius e observados sob luz polarizada a qual revela detalhes adicionais sobre a organização estrutural do colágeno mostrou modificações ligadas a doença nesse componente da matriz extracelular. De forma semelhante no tecido normal cores associadas ao colágeno encontravam-se homoganeamente distribuídas nas trabéculas e sugeriam que os feixes encontravam-se mais juntos (Figura 9).

De forma diferente nas amostras da doença de Peyronie a coloração do colágeno apresentava uma notória ausência de orientação e tinham uma maior birrefringência heterogênea, a qual no conjunto implica numa organização frouxa dos feixes de colágeno (Figura 10).

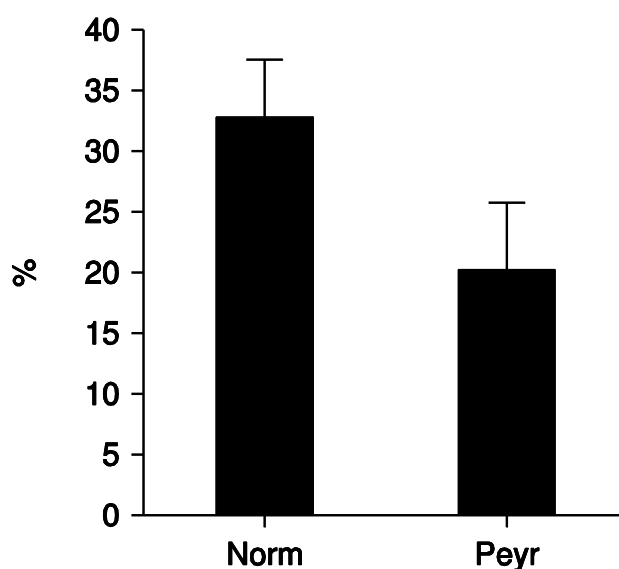
Figura 4 - Densidade volumétrica de fibras do sistema elástico



Legenda: (A), músculo liso (B), e tecido conjuntivo (C) no corpo cavernoso adjacente a túnica albugínea de 5 indivíduos normais (controle) e da placa fibrosa de 7 casos de pacientes com a doença de Peyronie. A barra representa média e desvio-padrão. Para cada parâmetro estereológico, os resultados para Peyronie foram comparados em relação ao grupo controle usando o teste de Wilcoxon, e diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) são indicadas por um asterisco.

Fonte: REBELLO, 2007.

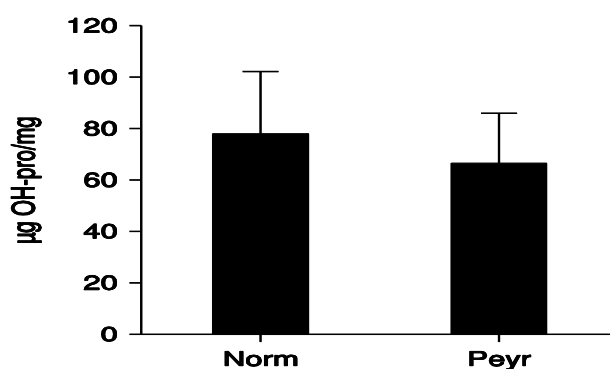
Figura 5 - Densidade volumétrica de fibras do sistema elástico na túnica albugínea de 5 indivíduos normais (controle) e placa fibrosa de 7 casos com a doença de Peyronie.



Legenda: A barra representa à média e desvio-padrão. O teste de Wilcoxon indicou que as duas médias são significativamente diferentes ( $<0.02$ )

Fonte: REBELLO, 2007.

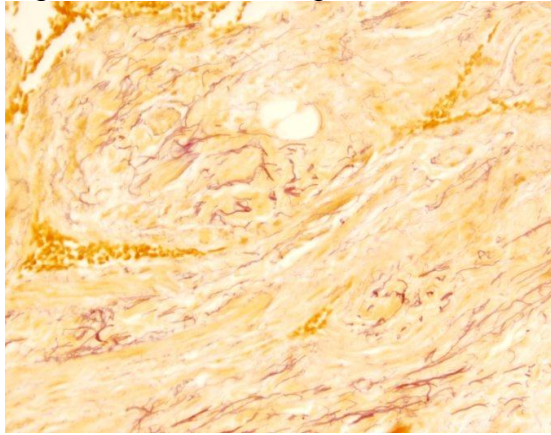
Figura 6 - Concentração do colágeno total no corpo cavernoso adjacente a túnica albugínea de 5 indivíduos normais (controle) e da placa fibrosa de 7 pacientes com a doença de Peyronie



Legenda: Amostras de tecidos foram submetidas a hidrólise acida, seguida pela dosagem de hidroxiprolina (OH-pro) para se estimar a concentração do colágeno, o qual é expresso como µg OH-pro por mg de tecido seco. A barra representa média e desvio-padrão. O teste de Wilcoxon indicou que as duas médias não eram significativamente diferentes.

Fonte: REBELLO, 2007.

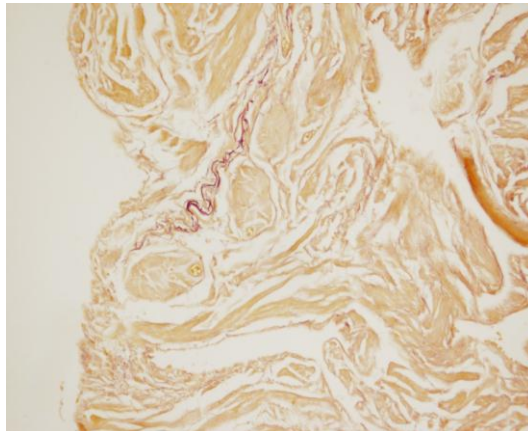
Figura 7: Fotomicrografia I



Legenda: Fotomicrografia das fibras do sistema elástico do corpo cavernoso. Grupo controle-Resorcina Fucsina de Weigert-400x

Fonte: REBELLO, 2007.

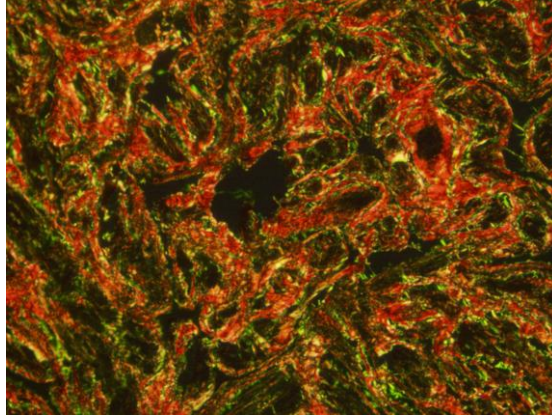
Figura 8: Fotomicrografia II



Legenda: Fotomicrografia das fibras do sistema elástico do corpo cavernoso. Grupo Peyronie- Resorcina Fucsina de Weigert-400x

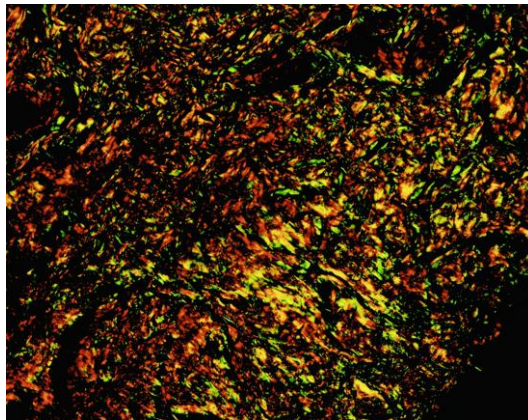
Fonte: REBELLO, 2007

Figura 9: Fotomicrografia III



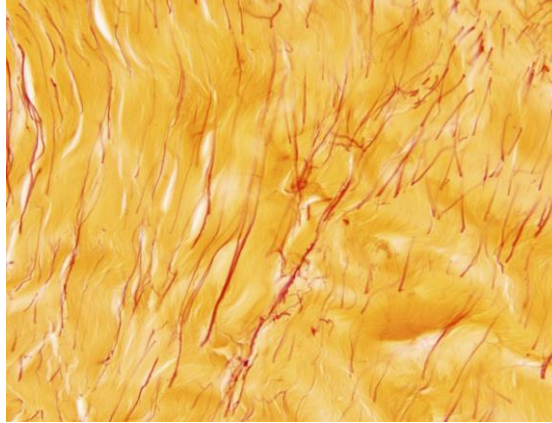
Legenda: Fotomicrografia do colágeno do corpo cavernoso. Grupo controle- Vermelho de PicroSirius-200x  
Fonte: REBELLO, 2007

Figura 10: Fotomicrografia IV



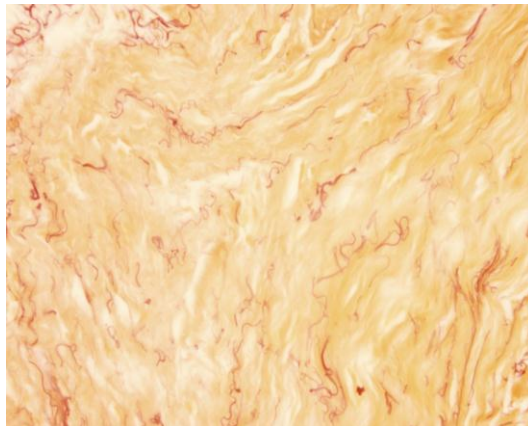
Legenda: Fotomicrografia do colágeno do corpo cavernoso. Grupo Peyronie- Vermelho de PicroSirius-200x  
Fonte: REBELLO, 2007

Figura 11: Fotomicrografia V



Legenda: Fotomicrografia das fibras do sistema elástico da túnica albugínea.  
Grupo controle-Resorcina Fucsina de Weigert-400x  
Fonte: REBELLO, 2007

Figura 12: Fotomicrografia VI



Legenda: Fotomicrografia das fibras do sistema elástico da túnica albugínea.  
Grupo Peyronie- Resorcina Fucsina de Weigert-400x  
Fonte: REBELLO, 2007



## 5 DISCUSSÃO

A doença de Peyronie é multi-fatorial em sua natureza. Existem inúmeras teorias sobre sua etiologia, porém a mais aceita é que a doença seja causada por uma reação de cicatrização excessiva na túnica albugínea devido a traumas repetitivos no pênis e que estariam possivelmente associados a uma pré-disposição genética (KADIOGLU et al., 2002).

Alguns estudos mostraram a associação da doença de Peyronie com disfunção erétil (WEIDNER et al., 1997), (KADIOGLU et al., 2000), (SCHWARZER, et al., 2001), (KADIOGLU. et al., 2004). Os nossos resultados parecem também apontar nessa direção. Os autores, no entanto, não esclareceram quais os componentes envolvidos e em que medida seriam afetados. Como o corpo cavernoso é a principal estrutura envolvida na ereção, é possível supor que, de alguma forma, os seus componentes, células musculares lisas, matriz extracelular, vasos sanguíneos e terminações nervosas, estejam envolvidos no processo. O que se pretende, portanto, é estudar as fibras musculares lisas, assim como a matriz extracelular do corpo cavernoso, que são os elementos essenciais para ereção peniana normal e têm sido associados a vários graus de disfunção erétil. (WESPES et al., 1991; SATTAR et al., 1996). Sabe-se também que a doença de Peyronie, pelo menos nos estágios iniciais, não causa impotência. É importante assinalar que nossas observações, dos diferentes elementos do corpo cavernoso, foram feitas em indivíduos potentes. Mesmo assim parecem indicar que, nestes indivíduos, já existe uma tendência que se caracterizou principalmente por uma diminuição, estatisticamente significativa, das fibras do sistema elástico. É possível hipotetizar que doença de Peyronie e disfunção erétil são manifestações distintas, temporalmente separadas porém são conseqüências de um mesmo problema.

### 5.1 Colágeno

Um estudo analisando 3 pacientes (idade variando entre 39 a 67 anos) com

doença de Peyronie mostrou que existe um aumento na quantidade do colágeno nos corpos cavernosos de indivíduos com Peyronie (LUANGKOT et al., 1992). Os resultados desse autor se referem a indivíduos que apresentavam a doença porém já eram impotentes. Os nossos resultados, em relação ao colágeno, não mostraram alterações estatisticamente significativas tanto na análise quantitativa em microscopia de luz quanto nas análises bioquímicas.

A observação dos cortes corados pelo Vermelho de Picrosirius e observados em luz polarizada mostrou uma grande quantidade de fibras coradas em verde contrastando com aquelas coradas em vermelho alaranjado o que pode sinalizar não somente para a existência de diferentes tipos de colágeno, como para o aparecimento de um colágeno jovem nesses indivíduos (JUNQUEIRA, 2004). Se bem que o método não seja específico para determinação de tipos de colágeno uma maior quantidade de fibras apresentando a cor verde pode significar uma possível proliferação do colágeno nesses indivíduos. É preciso salientar, no entanto, que as amostras observadas eram de indivíduos potentes.

## 5.2 Sistema elástico

Foi descrita a importância das fibras do sistema elástico para a obtenção e manutenção da ereção (SATTAR et al., 1994). A perda dessa elasticidade pode tornar o pênis menos resistente a dilatação durante a ereção com uma conseqüente diminuição da pressão e dessa forma contribuir para a instalação de condições que venham resultar em disfunção erétil.

Apesar dos indivíduos analisados serem potentes nossos resultados, mostraram que na doença de Peyronie, e no período em que foram analisadas, as fibras do sistema elástico mostraram alterações quantitativas estatisticamente significativas sendo, portanto, o primeiro sistema a apresentar alterações conspícuas nos corpos cavernosos de indivíduos com a doença.

Uma análise quantitativa das fibras do sistema elástico do corpo cavernoso, feita em indivíduos que apresentavam disfunção erétil, devido a diferentes causas, apresentou resultados semelhantes àqueles encontrados no corpo cavernoso

adjacente à placa fibrótica (COSTA et al., 2006). O mesmo resultado com relação às fibras elásticas foi encontrado por (IACONO et al., 1994) que mostraram uma diminuição de fibras elásticas na túnica albugínea e corpo cavernoso de pacientes com disfunção erétil também causado por fatores diversos. Em um estudo foi avaliada a disfunção veno-oclusiva como sendo o principal fator em 59% de impotência nos pacientes com a doença de Peyronie (LOPEZ; JAROW, 1993). É possível que esta obstrução tenha como consequência uma diminuição das fibras do sistema elástico.

### 5.3 Fibras musculares lisas

Com relação às fibras musculares lisas não houve alteração significativa. Esses resultados novamente estão de acordo com aqueles encontrados por Costa et al (2006) com relação à indivíduos com disfunção erétil grave. A mesma observação foi feita por (JEVTICH et al., 1990) que estudando pacientes potentes e impotentes observou que nestes indivíduos, embora houvesse uma pequena redução na quantidade de músculo liso, esta redução não era estatisticamente significativa. De acordo com o trabalho de (JEVTICH et al., 1990) as modificações mais importantes nas fibras musculares lisas não estão no número, mas em alterações ultra-estruturais.

Os resultados obtidos nos levam a supor que a doença de Peyronie não está restrita unicamente a túnica albugínea e, de alguma forma, afeta o tecido erétil do pênis. Os resultados obtidos demonstram também que, dos elementos da matriz extracelular, as fibras do sistema elástico são as primeiras a sofrer modificações.

Dessa forma podemos supor que uma incidência muito grande de casos de Disfunção sexual erétil em paciente portadores da doença de Peyronie se deva as alterações concomitantes e progressivas no corpo cavernoso e que certamente acompanhariam a doença.

Se bem que o local analisado tenha sido aquele obtido imediatamente abaixo da placa é possível especular que os fatores que atuam naquela região atuem também em todo o corpo cavernoso culminando em disfunção erétil.

## 6 CONCLUSÃO

Foram observadas alterações estatisticamente significativas nas fibras do sistema elástico. As fibras musculares lisas e o colágeno não apresentaram diferenças significativas. Por outro lado também foi observado um padrão diferente de coloração através do Vermelho de Picrosirius em relação ao controle. Estes dados nos permitem supor que na doença de Peyronie o corpo cavernoso do pênis também se encontra comprometido o que poderia contribuir para a disfunção erétil.

## REFERÊNCIAS

AKKUS, E; CARRIER, S; BABA, K; HSU, GL; PADMA-NATHAN, H, NUNES, L, LUE TF. Structural alterations in the tunica albuginea of the penis: impact of Peyronie's disease, ageing and impotence. *Br J Urol*, n.79, p. 47-53, 1997.

BANCROFT JD; COOK HC. *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.

BERGMAN I; LOXLEY R. The determination of hydroxyproline in urine hydrolysates. *Clin Chim Acta*, n.27, p.347-349, 1970.

BRANT WO; BELLA AJ; GARCIA MM; TANTIWONGSE K; LUE TF. Surgical Atlas. Correction of Peyronie's disease: plaque incision and grafting. *BJU Int*, n. 97, p.1353-1360, 2006.

CABRAL CA; SAMPAIO FJ; CARDOSO LE. Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycan and collagen as a consequence of changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. *J Urol*, n.170, p.2512-2516, 2003.

COSTA WS; CARRERETE FB; HORTA WG; SAMPAIO FJ. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU Int*, n.97, p. 567-569, 2006.

COTTA-PEREIRA G. *Contribuição ao estudo das fibras do sistema elástico*. In: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.1984.

CRUZ-ORIVE LM; WEIBEL ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol*, n.258, p.148-156, 1990.

DEVINE CJ; Jr., SOMERS KD; JORDAN SG, SCHLOSSBERG SM. Proposal: trauma as the cause of the Peyronie's lesion. *J Urol* . n.157. p.285-290.1997.

EL-SAKKA AI. Prevalence of Peyronie's disease among patients with erectile dysfunction. *Eur Urol*. n.49, p.564-569. 2006.

EL-SAKKA AI; HASSAN MU; NUNES L; BHATNAGAR RS, YEN TS; LUE TF. Histological and ultrastructural alterations in an animal model of Peyronie's disease. *Br J Urol*, n.81, p.445-452.1998.

EL-SAKKA AI; HASSOBA HM; PILLARISETTY RJ; DAHIYA R, LUE TF. Peyronie's disease is associated with an increase in transforming growth factor-beta protein expression. *J Urol*. n.158, p.1391-1394. 1997.

GHOLAMI SS; GONZALEZ-CADAVID NF; LIN CS; RAJFER J; LUE TF. Peyronie's disease: a review. *J Urol*. n.169, p.1234-1241.2003.

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*, n.20, p.259-266.1982.

HAAG SM; HAUCK EW; SZARDENING-KIRCHNER C; DIEMER T; CHA ES; WEIDNER W; EICKELBERG O. Alterations in the transforming growth factor (TGF)-beta pathway as a potential factor in the pathogenesis of Peyronie's disease. *Eur Urol*.n.51. p.255-261.2007.

IACONO F; BARRA S; de ROSA G; BOSCAINO A; LOTTI T. Microstructural disorders of tunica albuginea in patients affected by impotence. *Eur Urol*, n.26. p.233-239. 1994.

JEVTICH MJ; KHAWAND NY; VIDIC B. Clinical significance of ultrastructural findings in the corpora cavernosa of normal and impotent men. *J Urol*, n.143, p.289-293.1990.

JUNQUEIRA L.C. *Histologia Básica*, 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KADIOGLU A; OKTAR T; KANDIRALI E; KENDIRCI M; SANLI O; OZSOY C; Incidentally diagnosed Peyronie's disease in men presenting with erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. n.16, p.540-543.2004.

KADIOGLU A; TEFEKLI A; EROL B; OKTAR T; TUNC M; TELLALOGLU S. A retrospective review of 307 men with Peyronie's disease. *J Urol*. n.168. p.1075-1079.2002.

KADIOGLU A; TEFEKLI A; EROL H; CAYAN S; KANDIRALI E. Color Doppler ultrasound assessment of penile vascular system in men with Peyronie's disease. *Int J Impot Res*, n.12, p. 263-267.2000.

KADLER KE; HOLMES DF; TROTTER JA; CHAPMAN JA. Collagen fibril formation. *Biochem J*. n.316, p.1-11. 1996.

KENDIRCI M; TROST L; SIKKA SC; HELLSTROM WJ. Diabetes mellitus is associated with severe Peyronie's disease. *BJU Int*, n.99, p.383-386.2007.

LOPEZ JA; JAROW JP. Penile vascular evaluation of men with Peyronie's disease. *J Urol* . n.149, p.53-55.1993.

LUANGKHOT R; RUTCHIK S; AGARWAL V; PUGLIA K; BHARGAVA G; MELMAN A. Collagen alterations in the corpus cavernosum of men with sexual dysfunction. *J Urol*. N. 148, p.467-471.1992.

MANDARIM-de-LACERDA CA. *Métodos quantitativos em morfologia*. Rio de Janeiro: EdUERJ, 1995.

MANDARIM-de-LACERDA CA. *Stereology*. In: The Normal and Pathological Morphologic Research. *Biomed Research*, n.9, p. 153-163,1998.

MECHAM RP; E. HJ. *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2<sup>a</sup> ed: Plenum Press, 1991.

RICHARD L. Drake, Vogl. W, Mitchell AWM. *Gray's Anatomia para Estudante*. Rio de Janeiro: Elsevier Science, 2005.

ROSS R; BORNSTEIN P. The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J Cell Biol*. n.40, p.366-381,1969.

ROYET JP. Stereology: a method for analyzing images. *Prog Neurobiol* , n.37, p.433-474, 1997.

SATTAR AA; MERCKX LA; WESPES E. Penile electromyography and its smooth muscle content: interpretation of 25 impotent patients. *J Urol* . n.155, p.909-912. 1996.

SATTA AA; WESPES E; SCHULMAN CC. Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. *Eur Urol*. n.25, p.142-144.1994.

SCHWARZER U; SOMMER F; KLOTZ T; BRAUN M; REIFENRATH B; ENGELMANN U. The prevalence of Peyronie's disease: results of a large survey. *BJU Int*. n.88, p.727-730, 2001.

SMITCH CJ; MCMAHON C; SHABSIGH R. Peyronie's disease: the epidemiology, aetiology and clinical evaluation of deformity. *BJU Int*.2005.

SOKAL RR; FJ. R. *Biometry*, 3rd ed ed. New York: WH Freeman, 1995.

SOMERS KD; DAWSON DM. Fibrin deposition in Peyronie's disease plaque. *J Urol* n.157, p.311-315,1997.

VAN der REST M; GARRONE R. Collagen family of proteins. *Faseb J*, n.5, p.2814-2823, 1991.

WALSH; RETIK; VAUGHAN; WEIN. *Campbell's Urology*, Eighth ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Science, 2002,

WEIBEL ER; KISTLER GS; SCHERLE WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* n. 30, p.23-38,1966.

WEIDNER W; SCHROEDER-PRINTZEN I; WEISKE WH; VOSSHENRICH R. Sexual dysfunction in Peyronie's disease: an analysis of 222 patients without previous local plaque therapy. *J Urol.* n.157, p.325-328,1997.

WESPES E; GOES PM; SCHIFFMANN S; DEPIERREUX M; VANDERHAEGHEN JJ; SCHULMAN CC. Computerized analysis of smooth muscle fibers in potent and impotent patients. *J Urol.* n.146, p.1015-1017,1991.



**ANEXO A** - Resumo aceito para apresentação na American Urological Association (AUA). Annual Meeting 17-22 may 2008 Orlando Florida, USA

Stereological and Biochemical analysis of the connective tissue in the corpus cavernosum adjacent to the fibrous plaque of Peyronie Disease

Waldemar S. Costa, Sabrina L. Ribeiro, Andre Cavalcanti, Luiz E.M. cardoso, Francisco J.B

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

#### INTRODUCTION AND OBJECTIVE:

Studies on Peyronie disease(PD) usually focus the analysis on the fibrous plaque that forms in the tunica albuginea (TA). Because this fibrotic reaction is mediated by various inflammatory soluble factors(Davila HH et al. Urol 2005;65:645-8), adjacent connective tissues might also be affected. This secondary effect might explain,for example, the erectile dysfunction that occurs in this disease. We thus investigated the structural organization of the connective tissue in the corpus cavernosum(CC) adjacent to the fibrous plaque using stereological and biochemical techniques.

#### METHODS:

During surgery of 7 patients (mean age 48.3 yeas), biopsies were obtained from the CC adjacent to the fibrous plaque and from the plaque itself. All patients had normal erection. Controls were similarly located samples from normal patients obtained during autopsy of 5 individuals (mean age 52.3 years). Tissue samples were

stained with Weigert stain (elastic fibers), Van Gieson's stain (connective tissue), and Sirius red (collagen). Stereological analysis was done using a 100-point grid to determine volumetric densities ( $V_v$ ). Total collagen content was estimated as mg hydroxyproline per mg dry CC.

## RESULTS:

$V_v$  of elastic fibers was significantly reduced by 17.3% in PD compared with controls ( $19.49\% \pm 3.27\%$  vs  $23.56\% \pm 1.87\%$ ;  $p < 0.05$ ), while SMC ( $34.46\% \pm 2.06\%$ ) and connective tissue ( $35.39\% \pm 6.15\%$ )  $V_v$  in this disease were not significantly different from those of controls ( $38.38\% \pm 3.17\%$  and  $38.02\% \pm 5.03\%$ , respectively).  $V_v$  of elastic fibers in the fibrous plaque was decreased by 38.3% compared with the normal TA ( $20.25\% \pm 5.49\%$  vs  $32.81\% \pm 4.75\%$ ;  $p < 0.02$ ), and collagen concentration in the CC from controls ( $77.94 \pm 24.26$  mg/mg) and PD ( $66.57 \pm 19.39$  mg/mg) did not differ significantly. Sirius red-stained sections under polarized light revealed that, in the normal CC, collagen-associated colors were homogeneously distributed. In PD, stained collagen had a disrupted orientation and had a more heterogeneous birefringence, which imply looser collagen bundles.

## CONCLUSIONS:

The quantitative analysis indicated that collagen in the CC close to the fibrous plaque was not affected, although its organization was not noticeably altered. Cavernosal elastic fibers were reduced though, and similar change was found in the fibrous plaque of the TA. These results suggest that, although occurring primarily in the TA, the PD fibrous plaque induce changes in the adjacent CC.

**ANEXO B** - Artigo submetido e aceito no British Journal of Urology International

## STEREOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF MUSCULAR AND CONNECTIVE TISSUE COMPONENTS IN THE PENILE CORPUS CAVERNOSUM ADJACENT TO THE FIBROUS PLAQUE OF PEYRONIE DISEASE

## INTRODUCTION

Peyronie Disease (PD) is thought to be a connective tissue disorder of the penile tunica albuginea (TA). It occurs more frequently in men aged 40 to 60 years (1), (2), and investigations have shown that its prevalence can vary from 0.38% to 23%, depending on the population under study. Although in the past this disease was usually considered as rare, more recent studies have demonstrated that the incidence of PD is much higher than previously thought (3), (4).

PD can be regarded as a response to recurring microvascular trauma, which leads to exaggerated healing of the TA (5). This response initiates as a perivascular inflammatory infiltrate in the TA and ends up with the formation of a fibrotic plaque consisting mostly of scar tissue (6). Collagen and elastic fibers are highly disorganized in this plaque, an alteration that adversely affects the extensibility and compliance of the TA, thereby leading to penile deformity (7), (8). The plaque is usually located on the dorsal surface of the penis. Lateral, ventral, as well as hourglass deformities may also occur. The latter is more rare, and results in even greater difficulty for penetration (5).

The etiology of PD is still unclear. Most studies have shown that trauma during penetration is the likely stimulus that triggers the fibrotic response, which itself may be modulated by genetic pre-disposition. Other hypotheses to explain the onset of PD include a failure in fibrin removal, collagen alterations, and loss of tissue elasticity due to normal aging, which places a stress on the TA (1). Recently, (2) showed that, in patients suffering from diabetes mellitus, penile curvature is more severe. A number of histological studies revealed that there is an increase in the expression of

TGF- $\beta$ 1, an important mediator in inflammatory processes, in plaques from PD patients (9, 10), (5), (11). Additionally, because PD is associated with Dupuytren contracture (15% to 25%), auricular fibrosis, plantar fibromatosis, and scleroderma, an autoimmune factor may also be involved (7). Other possible causative factors of PD include vascular abnormalities and psychological disorders. These might act as potential mechanisms for the development of erectile dysfunction in men with PD (12), (13).

In the initial stages of the disease, most PD patients do not report difficulties for obtaining or maintaining erection. However, in later stages, penetration becomes difficult not only because of the deformity but also because of pain.

Clinical studies have shown an association between erectile dysfunction and PD, although this is still not well established (4), (3), (14). One of the hypothesis to explain erectile dysfunction in some PD patients stresses the importance of damage to structural components of the TA, with progressive reduction in the amount of elastic fibers and a disruption of collagen bands (8).

In general, investigations about PD focus the analysis on the primary lesion, i.e., on structural alterations of the TA and its fibrous plaque. However, it is possible that other regions of the penis be also affected, especially those that are close to the plaque, such as the adjacent corpus cavernosum (CC). If such an ancillary lesion exists, it might explain, at least in part, the erectile dysfunction that is normally associated with PD patients.

This issue has been addressed in the present study, whose objective was to analyze, using morphological and biochemical methods, the connective tissue of the penile CC adjacent to the fibrous plaque from PD patients.

## MATERIAL AND METHODS

### *Patients and tissue samples*

Biopsies from fibrous plaque on the TA and from the immediately adjacent CC were obtained from seven patients aged 40 to 68 years (mean, 48.3 years) during

corrective surgery to treat PD. The criteria for prescribing surgery to these patients were the presence of penile curvature greater than 45 degrees associated with significant impairment of vaginal penetration, and a period of at least six months of penile curvature stability. During pre-operative evaluation, all patients reported spontaneous erections without the need of oral drugs. Also, drug-induced erection tests using prostaglandin were carried out in all patients to assess the degree of curvature and penile rigidity, which was adequate after administration of 10 mg of the drug. The surgical procedure consisted of an H incision of the plaque associated with a penile crura graft (15). Controls consisted of equivalent TA and CC macroscopically normal samples obtained during autopsy of five men aged (mean 52.3 years) and who had died of accidents.

#### *Histology and stereology*

Tissue specimens were fixed in 10% buffered formalin and routinely processed for paraffin embedding. Five- $\mu$ m sections were obtained and stained with: (a) hematoxylin-eosin to assess to integrity of the tissue; (b) Weigert's resorcin-fuchsin with previous oxidation to stain all fibers of the elastic fiber system; (c) Van Gieson's stain to label connective tissue and smooth muscle cells; and (d) Picrosirius red under polarized light to detect differences in overall connective tissue organization. The specificity of the Weigert's method was confirmed by immunolabeling with an anti-elastin antibody (monoclonal, E 4013, Sigma, Saint Louis, MO, USA), and that of the smooth muscle staining by immunolabeling with an anti-smooth muscle alpha actin (Zymed Laboratories, 08-0106 predilute antibody).

Morphological data was quantitative using stereological methods. For each individual and for each histological staining technique, ten sections of TA and CC were obtained, and for each section ten fields were analyzed. All images were photographed with a digital camera directly coupled to the microscope and at a final magnification of X200. The volumetric density ( $V_v$ ) of histological structures was then measured by superimposing an M-42 test system on the digital images.

### *Preparation of cavernosal tissue for biochemical analysis*

Immediately after excision during surgery or autopsy, cavernosal tissue samples were fixed in cold acetone and kept in this fixative for 24 hours at 4°C. The samples were then finely minced and submitted to two changes of 24 hours each in 40 mL of chloroform:methanol (2:1, v/v) at room temperature. The solvent was then decanted, and after incubation at 60°C for 30 minutes, a preparation of dry and defatted cavernosal tissue was obtained and weighed.

### *Concentration of total collagen*

The concentration of total collagen in the cavernosal tissue was determined by a colorimetric hydroxyproline assay. Thus, from 5 to 14 mg of dry, defatted CC were hydrolyzed in 6N HCl for 18 hours at 118°C as previously described (16). The assay was then carried out in the neutralized hydrolyzates using a chloramin T method (17). Results were expressed as micrograms of hydroxyproline per milligram of dry, defatted tissue.

### *Statistics*

Statistical procedures followed (18). Comparison of stereological and biochemical parameters between controls and PD patients was done by a two-tailed Wilcoxon two-sample test. All results are given as means  $\pm$  their standard deviations, and statistical significance was considered when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The stereological quantitations in the corpus cavernosum showed that the volumetric density of elastic fibers was significantly reduced by 17.3% in Peyronie

disease compared with controls ( $19.49\% \pm 3.27\%$  vs  $23.56\% \pm 1.87\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Figs. 1A, 4 & 5). In contrast, volumetric densities of smooth muscle ( $34.46\% \pm 2.06\%$ ) and connective tissue ( $35.39\% \pm 6.15\%$ ) in this disease were not significantly different from those of controls ( $38.38\% \pm 3.17\%$  and  $38.02\% \pm 5.03\%$ , respectively) (Figs. 1B, 1C, 6 & 7).

To investigate whether the penile tissue primarily affected by Peyronie disease was similarly altered, the relative content of elastic fibers in the tunica albuginea was also determined. As in the corpus cavernosum, the volumetric density of elastic fibers in the Peyronie fibrous plaque was decreased by 38.3% compared with the normal tunica albuginea ( $20.25\% \pm 5.49\%$  vs  $32.81\% \pm 4.75\%$ ;  $p < 0.02$ ) (Fig. 2; 8 & 9).

The stereological results concerning connective tissue content in the corpus cavernosum were further confirmed by the biochemical determination of total collagen concentration. Thus, the results showed that this concentration in the cavernosal tissue from controls ( $77.94 \pm 24.26 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) and Peyronie disease ( $66.57 \pm 19.39 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) did not differ significantly (Fig. 3).

The quantitative analyzes therefore indicated that cavernosal collagen close to the fibrous plaque was unchanged in Peyronie patients. However, histological preparations using Sirius red staining observed under polarized light, which reveals additional details about the structural organization of collagen, did show disease-related modifications in this component of the extracellular matrix. Accordingly, in the normal tissue, collagen-associated colors were homogeneously distributed in the trabeculae and suggested that the bundles were more tightly packed (Fig. 3, 6). Conversely, in Peyronie samples, stained collagen had a noticeably disrupted orientation and had a more heterogeneous birefringence, which altogether imply a looser organization of the collagen bundles (Fig. 7).

## DISCUSSION

Many theories have been proposed about the etiology of PD. According to the most widely accepted one, the disease is caused by an excessive healing in the TA due to repeated trauma to the penis, together with a genetic pre-disposition (19). This injury might affect the erectile tissue, and in fact there is evidence showing an

association between PD and erectile dysfunction (20), (21), (3), (14). However, these studies did not investigate the underlying mechanisms that would account for the dysfunction. Because the CC is the main structure involved in erection, components of this tissue, such as smooth muscle cells, the extracellular matrix, blood vessels, and nerve endings might be altered and thereby affect erection. In the present study we focused our analysis on smooth muscle cells and the extracellular matrix of the CC, which are important components involved in normal erection and in erectile dysfunction (22), (23). Our results showed that these components are modified in the CC close to the fibrous plaque, which therefore supports an association between PD and erectile dysfunction.

In its earlier stages, PD does not affect sexual function, and our findings were indeed obtained from PD patients that had normal erection. Our results suggest, however, that these individuals may eventually develop erectile dysfunction as the CC already showed significant alterations.

### Collagen

In a study using three PD patients aged 39 to 67 years, the authors found an increased collagen content in the CC (24). The patients, however, were already suffering from erectile dysfunction. Our collagen results using both morphological and biochemical methods did not show a significant difference between the PD and the normal CC. Still, results of the Picrosirius staining imply alterations in the overall organization of collagen bundles in PD (25).

### Elastic fiber system

(26) described the importance of elastic fibers for obtaining and sustaining erection. Loss of tissue elasticity can make the penis less resistant to dilation during erection, which results in lower cavernosal pressure and thereby may contribute to the onset of erectile dysfunction. Although the PD patients under study were potent,



our results showed that their cavernosal elastic fibers were significantly reduced. Therefore, this reduction may be the one of the earliest alterations in the CC of PD patients.

A qualitative analysis of the CC, carried out in individuals suffering from erectile dysfunction due to various causes (27), revealed a content of elastic fibers that is similar to that found in the present study. Approximately the same result was obtained by (28), which showed a decrease in the amount of elastic fibers in the TA and CC from patients with erectile dysfunction also due to various causes. (12) evaluated the veno-occlusive dysfunction and found it to be the main causative factor associated with impotence in PD patients. It is possible that this obstruction be related to a decrease in the content of elastic fibers.

### Smooth muscle

Cavernosal smooth muscle was not changed in PD. Again, these results are in agreement with those by (27), who studied individuals with severe erectile dysfunction. The same observation was made by (29) in an investigation using potent and impotent individuals. According to this latter study, the most important modification in smooth muscle was not a variation in cell number, but changes in ultrastructural features.

Our results imply that PD is not restricted to the TA, as it somehow affects the underlying erectile tissue. Our results also indicate that, of the extracellular matrix components, elastic fibers are one of the first to undergo modifications. Thus, it may be concluded that the high incidence of erectile dysfunction among PD patients is due to simultaneous and progressive alterations in the CC. Although our results refer only to the CC adjacent to the fibrous plaque, it is possible that the factors that induced this supposedly early alteration will eventually affect deeper regions of the tissue, thereby leading to erectile dysfunction.