



Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ  
Centro Biomédico – Faculdade de Ciências Médicas  
Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia  
e Ciências Cirúrgicas – PG-FISIOCIRURGIA

# **ALTERAÇÕES DO TECIDO CONJUNTIVO E MÚSCULO LISO NO PÊNIS DE COELHOS DIABÉTICOS**

**Marcelo Abidu Figueiredo**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, PG-Fisiocirurgia, UERJ, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor.

**Orientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio**

**Co-orientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa**

**Rio de Janeiro, RJ - Brasil  
2009**



Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ  
Centro Biomédico – Faculdade de Ciências Médicas  
Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia  
e Ciências Cirúrgicas – PG-FISIOCIRURGIA

**Marcelo Abidu Figueiredo**

**ALTERAÇÕES DO TECIDO CONJUNTIVO E  
MÚSCULO LISO NO PÊNIS DE COELHOS  
DIABÉTICOS**

**Rio de Janeiro  
2009**

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

F475 Abidu- Figueiredo, Marcelo.

Alterações do tecido conjuntivo e músculo liso no pênis de coelhos diabéticos / Marcelo Abidu Figueiredo.- 2009.  
xii, 57f. : il.

Orientador : Francisco José Barcellos Sampaio.

Co-orientador : Waldemar Silva Costa.

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

Bibliografia: f. 45-56.

1. Pênis - Teses. 2. Coelho como animal de laboratório - Teses. 3. Estereologia - Teses. 4. Histologia - Teses. 5. Diabetes - Complicações e seqüelas - Teses. 6. Disfunção erétil - Teses. I. Sampaio, Francisco José Barcellos. II. Costa, Waldemar Silva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.66

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

---

Assinatura

Data

O presente trabalho foi realizado na Unidade de Pesquisa Urogenital, Centro Biomédico, Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Recebeu apoio financeiro, direta ou indiretamente, de CNPq, FAPERJ e CAPES

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

F475 Figueiredo, Marcelo Abidu.  
Análise estrutural das alterações do tecido conjuntivo e  
músculo liso no pênis de coelhos diabéticos / Marcelo Abidu  
Figueiredo.- 2009.  
xii, 57f. : il.

Orientador : Francisco José Barcellos Sampaio.  
Co-orientador : Waldemar Silva Costa.  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em  
Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.  
Bibliografia: f. 45-56.

1. Pênis - Teses. 2. Coelho como animal de laboratório -  
Teses. 3. Estereologia - Teses. 4. Histologia - Teses. 5.  
Diabetes - Complicações e seqüelas - Teses. 6. Disfunção  
erétil - Teses. I. Sampaio, Francisco José Barcellos. II. Costa,  
Waldemar Silva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.66

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

---

Assinatura

---

Data

## **AGRADECIMENTOS TÉCNICOS**

*A Médica Veterinária Ilma Cely Amorim  
Ribeiro pela colaboração no preparo dos cortes  
histológicos.*

*Ao Médico Veterinário Carlos Eduardo  
Rodrigues Caetano pela colaboração no  
manuseio dos animais.*

*A Carla Braga Mano Gallo pela colaboração  
nas edições fotográficas.*

## **CONFLITO DE INTERESSES**

Não há conflito de interesses.

# ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1- INTRODUÇÃO	01
1.1 – Matriz Extracelular	07
1.1.1 – Colágeno	07
1.1.2 – Sistema Elástico	08
1.1.3 – Fibras Musculares	10
2 – OBJETIVO	11
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1- Comitê de Ética	14
3.2- Seleção e Preparação dos Animais	14
3.3- Processamento Histológico	15
3.3.1 – Tricrômico de Masson	15
3.3.2 – Fucsina – Resorcina de Weigert	16
3.3.3 – Picrosirius Red	16
3.3.4 – Imuno Histoquímica	16
3.4- Estereologia	17
3.4.1 – Colágeno/ Fibras Musculares Lisas	17
3.4.2 – Fibras do Sistema Elástico	18
3.5- Análise Estatística	19
4 - RESULTADOS	20
4.1 – Concentração de Glicose	21
4.2 - Análise Morfológica	22
4.2.1 – Túnica Albugínea	22
4.2.2 – Tecido Erétil	26
5 - DISCUSSÃO	37
6 - CONCLUSÕES	43
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8 - ANEXOS	57

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**DM** – Diabetes Mellitus

**DE** – Disfunção Erétil

**TA** – Túnica Albugínea

**CC** – Corpo Cavernoso

**CE** – Corpo Esponjoso

## RESUMO

### ALTERAÇÕES DO TECIDO CONJUNTIVO E MÚSCULO LISO NO PÊNIS DE COELHOS DIABÉTICOS

**Introdução:** Embora a disfunção erétil seja um problema freqüente em pacientes com diabetes mellitus, poucos estudos avaliaram as alterações da estrutura peniana nesta condição.

**Objetivo:** avaliar a densidade volumétrica de colágeno, fibras do sistema elástico e células musculares lisas no corpo cavernoso (CC), corpo esponjoso (CE) e túnica albugínea (TA) no pênis de coelhos diabéticos.

**Método:** Vinte seis coelhos Nova Zelândia foram utilizados.

A diabetes foi induzida em 13 coelhos com 8 semanas de idade com injeção intravenosa de 100 mg/ kg de aloxano. 13 coelhos normais serviram como controle. Após 10 semanas os animais foram mortos com overdose de thiopental sódico endovenoso. Os pênis foram dissecados retirando-se um fragmento da porção média sendo fixado em formol 10% tamponado (pH 7.3). Todo material foi processado para inclusão em parafina seguindo a técnica histológica de rotina.

**Principais medidas:** a análise estereológica do colágeno, das fibras do sistema elástico e do músculo liso foi realizada em cortes de 5µm no sistema teste M42. Os dados foram expressos em densidade volumétrica (Vv %). A organização de colágeno foi avaliada pela coloração do Picrosirius red sob polarização.

**Resultados:** na túnica albugínea de coelhos diabéticos, houve um aumento de 88% da espessura ( $p < 0.0003$ ) com um acentuado turnover do colágeno. Além disso, o conteúdo de fibras elásticas foi 34% maior ( $p < 0.0001$ ). No CC dos coelhos diabéticos o colágeno diminuiu 45% ( $p < 0.0001$ ) com a

presença de um colágeno mais organizado. As fibras do sistema elástico tiveram um decréscimo de 46% ( $p < 0.0001$ ). A diabetes induziu um aumento de 11% de colágeno no CE ( $p < 0.0235$ ) com um acentuado turnover do colágeno. No CC de coelhos diabéticos houve um aumento de 40% de músculo liso ( $p < 0.0001$ ), enquanto no CE uma diminuição de 38% ( $p < 0.0001$ ).

**Conclusão:** Os tecidos do pênis foram afetados de formas diferentes pela diabetes, possivelmente devido à heterogeneidade celular. Essas mudanças poderiam ter um impacto sobre o fluxo sanguíneo e resistência do tecido e, portanto, prejudicar a ereção.

**Palavras chave:** pênis, coelho, estereologia, histologia, diabetes, disfunção erétil.

## **ABSTRACT**

### **CONNECTIVE TISSUE AND SMOOTH MUSCLE ALTERATIONS IN DIABETIC RABBIT PENIS**

**Introduction:** Although erectile dysfunction is a frequent problem in patients with diabetes mellitus, few studies have evaluated penile structure alteration in this condition.

**Aim:** To assess the volumetric density of collagen, elastic system fibers and smooth muscles cells in the corpora cavernosa (CC), corpus spongiosum (CE) and tunica albuginea (TA) in the penis of diabetic rabbits. **Methods:** Twenty-six New Zealand white rabbits were used. Diabetes was induced at 8 weeks of age in 13 rabbits by intravenous injection of 100 mg/kg of alloxan. The remaining 13 rabbits served as a control group. After 10 weeks, the rabbits were killed using sodium thiopental. Mid-shaft fragments of the penis were obtained and processed by routine histological techniques.

**Main Outcome Measures:** Stereological analysis of collagen, elastic system fibers and smooth muscle was performed in 5- $\mu$ m sections by using a M42 System Test grid. Data were expressed as volumetric density (Vv - %). Collagen organization was evaluated by Picrosirius red staining under polarization.

**Results:** In the TA of diabetic rabbits, thickness increased by 88% ( $p < 0.0003$ ) with an enhanced collagen turnover. Moreover, the elastic fiber content was 34% higher ( $p < 0.0001$ ). In the CC of diabetics, collagen was diminished by 45% ( $p < 0.0001$ ) with a more organized collagen. The elastic fibers were decreased by 46% ( $p < 0.0001$ ). Diabetes induced a 11% increase in CS collagen ( $p < 0.0235$ ) with an enhanced collagen turnover. Smooth muscle in the CC of diabetic rabbits was increased by 40% ( $p <$

0.0001), whereas in the CS it was decreased by a similar amount ( $p < 0.0001$ ). **Conclusion:** Penile tissues were affected differently by diabetes, possibly due to cellular heterogeneity. These changes could have an impact on blood flow and tissue resistance, and therefore, might adversely affect erection.

**Key words:** penis, rabbit, stereology, histology, diabetes, erectile dysfunction.

# **1 – INTRODUÇÃO**

## 1 - INTRODUÇÃO

O termo Diabete em grego significa sifão. Foi proposto por um médico grego de nome Aretaeus (aproximadamente 150 A.C) com o objetivo de descrever uma doença em que os enfermos urinavam muito. No século XVI, um médico iraniano Avicena, descreveu os mais importantes sintomas e conseqüências da evolução da diabete: a gangrena e a disfunção sexual. Em 1776, o inglês Mathew Dobson demonstrou que o diabético eliminava açúcar pela urina, levando os médicos daquela época a pesquisarem os órgãos mais afetados pela doença. Mais tarde, aproximadamente no século XVIII, Paul Langerhans, estudante de medicina, publicou um trabalho sobre histologia do pâncreas, que descrevia um tipo desconhecido de células localizadas próximas aos ácinos e que não se comunicavam com os dutos excretores. Naquela época não pôde especificar as funções destas células [1].

A Diabete Mellitus (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas [2, 3].

A classificação atualmente recomendada incorpora o conceito de estágios clínicos da DM, desde a normalidade, passando para a tolerância à glicose diminuída e/ou glicemia de jejum alterada, até a DM propriamente dita [2, 3]. Essa classificação baseia-se na etiologia da 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 gestacional é a diminuição da tolerância à glicose, de magnitude variável, diagnosticada pela primeira vez na gestação, podendo ou não persistir após o parto. Os estágios da DM ocorrem em todos os tipos, sendo que no tipo 1 o período de tempo entre os estágios é mais curto.

A DM é acompanhada de complicações agudas e crônicas, que podem incluir dano, disfunção ou falência de órgãos, especialmente: rins, nervos, coração e vasos sanguíneos [2, 3].

É uma doença comum e de incidência crescente afetando aproximadamente 171 milhões de indivíduos em todo o mundo e com projeção para 366 milhões de pessoas no ano de 2030, pulando a prevalência de 2,8% em 2000 para 4,4% [4]. A maior parte desse aumento deve ocorrer em países em desenvolvimento. Neles se acentuará o atual padrão de concentração de casos na faixa etária de 45-64 anos [5].

No Brasil um estudo foi realizado para estimar a prevalência da DM e a tolerância à glicose diminuída na população urbana da cidade de São Carlos em São Paulo, com 1.116 voluntários com idade compreendida entre de 30 a 79 anos. As prevalências gerais da 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 [6].

A diabetes 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 invalidez 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 [7, 8].

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 [7, 8].

Pacientes com DM apresentam altas taxas de disfunção erétil (DE) e diferentes estudos demonstraram esta associação [9, 10, 11, 12, 13]. Estudos utilizando modelos animais e pacientes diabéticos mostraram que as alterações no sistema neurovascular parecem ser a causa primária da DE [11, 14].

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 [15]. Os modelos animais permitem controlar numerosas variáveis que normalmente não podem ser obtidas em estudos com seres humanos [16, 17, 18].

De acordo com a forma e com sua constituição histológica, o pênis dos mamíferos é classificado em fibro-elástico e músculo cavernoso. No pênis do tipo fibro-elástico, durante a cópula observa-se um aumento do comprimento peniano com poucas modificações no diâmetro. É encontrado nos boi, no porco e em ratos. No cavalo, cão e coelho observa-se que durante a cópula ocorre aumento tanto do comprimento quanto do

diâmetro, características do pênis do tipo músculo cavernoso que também é encontrado no homem [19, 20, 21].

O coelho é um animal de exploração zootécnica e considerado também como animal de laboratório. Por apresentar um pênis com as características semelhantes ao pênis humano 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 [22, 23, 24].

O pênis do coelho é dividido em raiz ou porção fixa, corpo ou porção intermediária e glande ou extremidade livre (Figura 1). A raiz é formada pelos pilares (corpos cavernosos) e pelo bulbo do pênis (corpo esponjoso). O corpo se estende desde a raiz até a glande e é formado pelo corpo cavernoso e esponjoso. A glande é formada por corpo esponjoso [19].

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 do pênis. Por outro lado, a artéria dorsal do pênis emite três pequenos ramos para o músculo isquiocavernoso e ao nível da fixação deste músculo emite dois pequenos ramos para o prepúcio. O curso de ambas as artérias segue a superfície dorsolateral do pênis em direção a glande onde sofrem anastomose [19, 25].

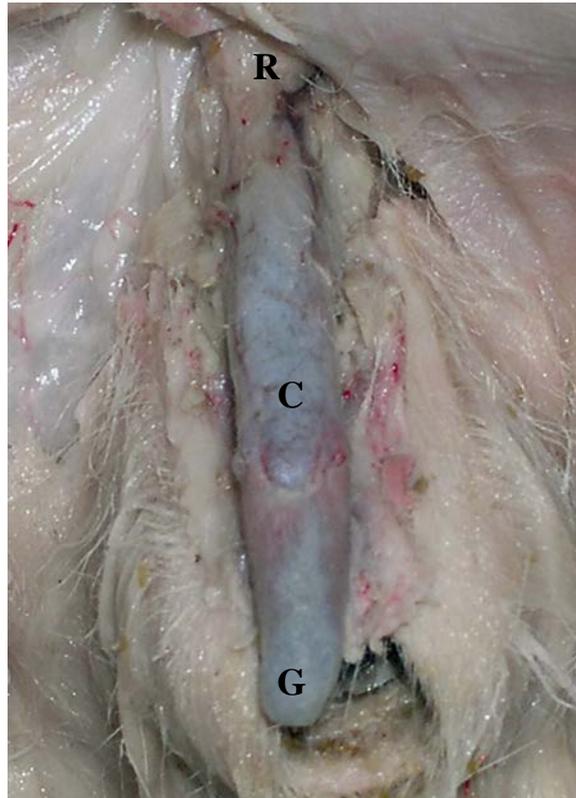


Figura 1: Fotomacrografia mostrando o pênis de um coelho com aproximadamente 120 dias de idade. R= Raiz, C = Corpo e G= Glande.

Histologicamente o pênis do coelho contém tecido erétil dispostos na forma de dois corpos cilíndricos dorsais denominados corpo cavernoso e corpo esponjoso. Este último é um pouco mais longo e se localiza ventralmente circundando a uretra. Essas duas estruturas são também envolvidas por uma fáscia peniana constituída de tecido conjuntivo denso fibroelástico, a túnica albugínea [19, 26, 24] (Figura 2).

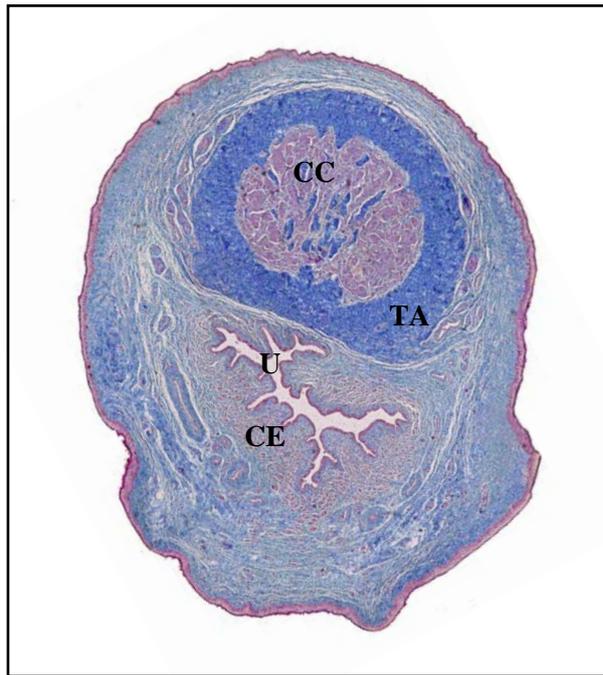


Figura 2: Fotomicrografia de corte transversal do corpo do pênis de coelho. CC= Corpo Caverno, TA= Túnica Albugínea, U= Uretra e CE= Corpo Esponjoso. Tricrômico de Masson 40X.

### **Matriz Extracelular**

Tem importante papel no crescimento e diferenciação celular. Ocupa em maior ou menor grau, o espaço intersticial de todos os sistemas orgânicos. Ela é constituída por uma rede complexa de macromoléculas onde os principais componentes fibrilares são o colágeno e as fibras do sistema elástico. Proteoglicanos, glicosaminoglicanos e as glicoproteínas são também componentes da matriz extracelular [27].

#### ***Colágeno***

É a proteína mais abundante do reino animal, representando cerca de 1/3 do total de proteínas encontradas nos tecidos [28]. É constituído por

três cadeias polipeptídicas (cadeias  $\alpha$ ) que podem ser idênticas (homotrímeros) ou diferentes (heterotrímeros). A estrutura primária das cadeias é formada por uma seqüência de três aminoácidos: glicina, prolina e hidroxiprolina que se repetem por grandes extensões. Cada cadeia de colágeno (cadeia  $\alpha$ ) 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. Estas moléculas apresentam uma grande tendência a se polimerizarem de uma forma ordenada originando as fibrilas de colágeno. Apesar de manterem a sua individualidade, as fibrilas de colágenos podem se organizar lateralmente formando fibras, e estas se organizarem em estruturas de maior espessura denominadas feixes de colágeno [29].

Várias classes de colágeno são identificadas com base em seu padrão de polimerização. O colágeno do tipo I é o mais encontrado nos tecidos conjuntivos em geral e formam fibras mais espessas. O colágeno do tipo III apresenta uma distribuição mais específica e é encontrado nos órgãos hematopoéticos e ao redor das fibras musculares lisas. Este tipo de colágeno forma fibras mais delgadas, também chamadas de fibras reticulares [28]. Devido à rica cobertura de glicídeos, as fibrilas de colágeno tipo III são evidenciadas preferencialmente por sais de prata. Estas fibrilas proporcionam sustentação para os capilares, nervos e células musculares, e estão intimamente associadas às membranas basais [30].

### ***Sistema elástico***

No tecido conjuntivo, as fibras do sistema elástico distinguem-se facilmente das colágenas por serem mais delgadas e não apresentarem

estriação longitudinal. Ramificam-se e ligam-se umas as outras, formando uma trama muito irregular. Em virtude da presença de um pigmento, as fibras elásticas, quando vistas a fresco em grande quantidade, têm cor amarelada. Essas fibras cedem facilmente mesmo às trações mínimas, porém retomam sua forma inicial tão logo cessem as forças deformantes [31].

As fibras do sistema elástico são caracterizadas pelo elevado grau de extensibilidade que apresentam. São encontradas em tecidos que estão constantemente submetidos a grandes forças de estiramento [32]. Por esta razão, os elementos fibroelásticos (colágeno e elastina) combinam-se para formar estruturas chave em tecidos complacentes.

A fibra elástica é uma estrutura complexa formada por elastina, proteína microfibrilar, lisil oxidase, e proteoglicanos [33].

Durante o processo de desenvolvimento de uma fibra elástica, o componente microfibrilar é o primeiro a aparecer, 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 [32].

De acordo com o grau de associação entre esses componentes, as fibras do sistema elástico são divididas em três grupos:

- a) Fibras Elásticas: constituídas em sua maior parte por elastina (em posição central) e um número reduzido de microfibrilas em posição periférica [34].
- b) Fibras Elaunínicas: constituída por pouca elastina e um grande número de microfibrilas [35].
- c) Fibras oxitalânicas: compostas exclusivamente por microfibrilas [36].

### *Fibras musculares*

As fibras musculares lisas são células longas, fusiformes e que apresentam um núcleo único e central. Estão dispostas geralmente em camadas, sobretudo na parede dos órgãos ocos, como os vasos sanguíneos. São revestidas por uma lâmina basal e mantidas juntas por uma delicada rede de fibras reticulares. Seu comprimento pode variar de 20 $\mu$ m na parede de pequenos vasos sanguíneos até 500 $\mu$ m no útero grávido, e apresentam um diâmetro de 5 a 6 $\mu$ m [30, 37, 31].

A atividade contrátil característica das fibras musculares lisas está relacionada com a estrutura e organização de seus filamentos de actina e miosina. Os feixes de miofilamentos se cruzam em todas as direções formando uma trama tridimensional. Estes feixes apresentam microfilamentos com 5-7 nm formados de actina e tropomiosina, e filamentos de miosina com 12-16 nm de espessura. Observações tanto bioquímicas como estruturais mostram que a contração se dá por um mecanismo de interação e deslizamento entre os filamentos [38, 31].

Apesar de inúmeros estudos terem relacionado os efeitos da diabete e a DE a caracterização morfológica das possíveis alterações dos diferentes elementos constitutivos do pênis ainda não foram devidamente estudadas. Por esse motivo procuramos analisar os elementos fibrosos da matriz extracelular, as fibras musculares lisas no corpo cavernoso, no corpo esponjoso e na túnica albugínea do pênis de coelhos normais e diabéticos.

## **2- OBJETIVO**

## **2- OBJETIVO**

Analisar as alterações estruturais dos elementos fibrosos da matriz extracelular e das fibras musculares lisas no pênis de coelhos Nova Zelândia normais e submetidos à diabete experimental.

## **3- MATERIAL E MÉTODOS**

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **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 Alcantara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Anexo-1.

#### **Seleção e Preparação dos Animais**

Foram estudados 26 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 permaneceram em gaiolas individuais, mantidos em temperatura ambiente, e receberam água à vontade e ração comercial duas vezes ao dia (ração peletizada, para coelhos em reprodução e crescimento). O experimento foi iniciado quando os animais completaram dois meses de idade, atingindo em média 2,0 kg de peso vivo.

Foram estabelecidos 2 grupos com 13 animais cada, o grupo tratado e o grupo controle. Os 13 coelhos do grupo tratado foram anestesiados com Xilazina (5mg/kg IM) e Ketamina (20mg/kg IM), e receberam aloxano na dose de 100mg/kg, via endovenosa na veia marginal da orelha [39, 18]. Foram coletadas, de todos os animais, amostras de sangue através da veia marginal da orelha no dia da indução do diabetes, 24h, 48h, 72h após a

aplicação do aloxano e toda semana. Para quantificação dos níveis séricos de glicose foi utilizado 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 [39, 18]. Decorridos 10 semanas do estabelecimento do diabetes, todos os animais (grupo controle e tratado) foram mortos com overdose de thiopental sódico endovenoso.

### **Processamento Histológico**

Os pênis foram dissecados e sofreram uma primeira clivagem. De cada pênis foi retirado um fragmento do corpo do pênis. O material foi fixado em formalina 10% tamponada.

Cada fragmento de pênis sofreu 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 [40, 41, 42].

Todos os cortes foram processados para inclusão em parafina seguindo a técnica de rotina. Cortes de 5  $\mu$ m de espessura foram obtidos e posteriormente corados por métodos histoquímicos e imuno-histoquímicos.

### ***Tricrômico de Masson***

Técnica histológica de rotina que permite evidenciar o colágeno em azul e as fibras musculares lisas em vermelho [43].

### ***Fucsina-Resorcina de Weigert***

Foi utilizada a técnica de Fucsina-Resorcina de Weigert com prévia oxidação com oxona para a evidenciação das fibras do sistema elástico. O reativo de Weigert é formado pela precipitação da fucsina básica-resorcina pelo cloreto de ferro demonstrando a presença de fibras elásticas e elaunínicas 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 e ácido oxálico promove um clareamento de fundo [36, 43], ressaltando as fibras elásticas coradas em violeta escuro.

### ***Picrosirius Red***

A técnica do Picrosirius red seguida de microscopia de polarização pode demonstrar de maneira seletiva os tipos I e III de colágeno. 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. Assim, o método do Picrosirius associado à microscopia de polarização é um método histoquímico específico para detecção de colágeno [44].

### ***Imuno-histoquímica***

Foi realizada a técnica de Avidina-Biotina para a identificação de fibras musculares lisas, utilizando-se os seguintes anticorpos primários: 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.

Para todos os anticorpos primários utilizados foram realizados simultâneamente, controles negativos, onde o anticorpo primário foi 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 biotilado diluído em 1:100 em PBS.

## **Estereologia**

### ***Colágeno / Fibras musculares lisas***

O contraste marcante entre as cores do colágeno azul e fibras musculares lisas (vermelho), nos cortes corados pelo tricrômico de Masson fez com que este método fosse utilizado preferencialmente para análise estereológica (densidade volumétrica - Vv) desses dois componentes do corpo cavernoso e esponjoso peniano.

De cada um dos 26 pênis foram selecionados 05 cortes com um intervalo de 50 micrômetros. De cada corte foram analisados 5 campos aleatórios perfazendo um de total 25 campos analisados por pênis. As lâminas foram observadas em microscópio de luz Olympus acoplado a uma

câmera de vídeo marca Sony CCD, sendo a imagem dos campos microscópicos repassada para um monitor Sony KX14-CP1. Os dados foram obtidos pelo método de contagem de pontos superpondo um sistema teste M 42 [45].

### ***Fibras do Sistema Elástico***

As fibras elásticas são dotadas de um conjunto de caracteres histoquímicos e de afinidades tintoriais que aumentam enormemente sua afinidade tintorial, o que facilita sua evidenciação seletiva.

Coloração pela fuscina-resorcina foi introduzida em técnica histológica por Weigert, pois fornece excelentes resultados para a coloração das fibras do sistema elástico [36, 43].

Para a determinação da percentagem (Vv) de fibras do sistema elástico os cortes foram corados pelo método da Fuscina-Resorcina de Weigert com prévia oxidação. Este método permite um contraste suficientemente grande para que a análise pudesse ser feita através de um sistema digital. Para a análise do sistema elástico foram utilizados os mesmos números de campos que para o colágeno e fibras musculares obedecendo-se também o mesmo critério quanto ao número de pênis e campos analisados.

Os campos foram digitalizados com um aumento final de 400 X através de uma câmara de vídeo marca Sony CCD acoplada a um microscópio de luz Olympus. Os dados foram obtidos pelo método de contagem de pontos superpondo um sistema teste M 42 [45] (Figura 3) .

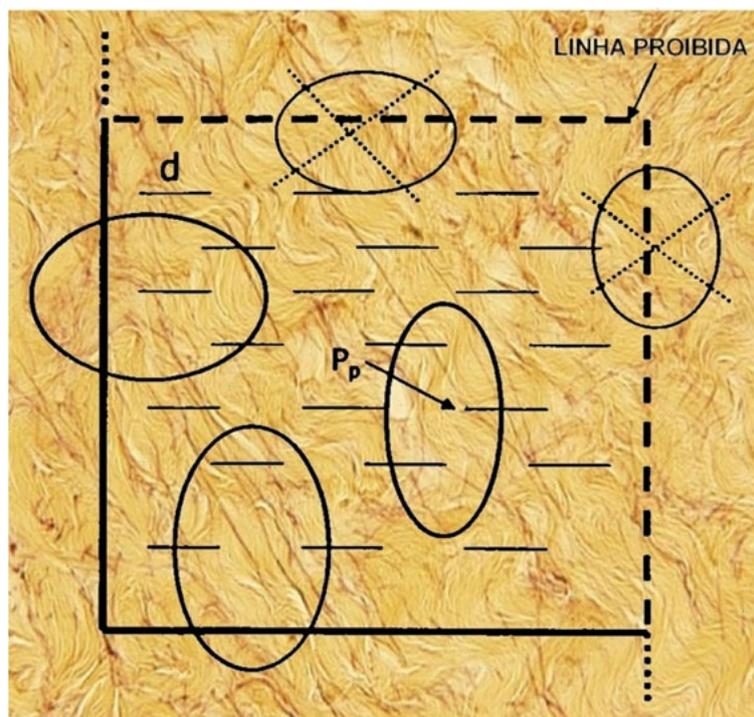


Figura 3: Fotomicrografia da túnica albugínea peniana de coelho, com superposição da grade M42 para análise estereológica. Fuscina-Resorcina de Weigert X 400.

Também foi aferida a espessura da túnica albugínea. Foram selecionadas cinco lâminas de cada animal. Em cada corte foi medida a espessura da albugínea em quatro pontos: dorsal, ventral e dois laterais, utilizando-se o software Image J versão 1.4 (NIH, Bethesda, USA), carregado com seu próprio “plugin” (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins>).

### **Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através do Software Grafpad Prism. Para comparação das médias foi utilizado o Teste T não pareado com intervalo de confiança de 95%, considerando  $p < 0.05$  como significativo.

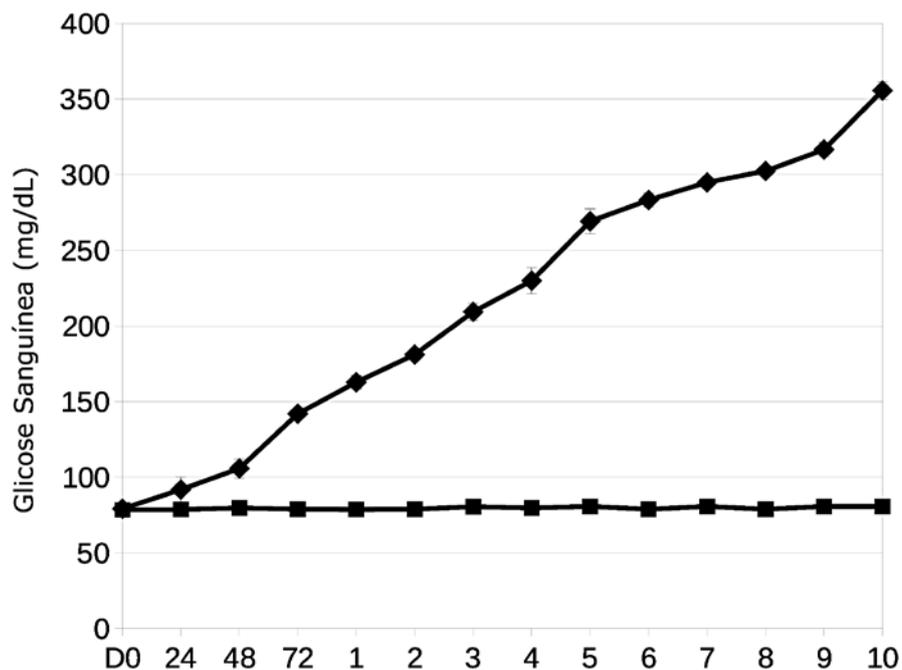
## **4 - RESULTADOS**

## 4 – RESULTADOS

### Concentração de Glicose

A concentração de glicose no sangue 72 horas após o tratamento com aloxano já havia atingido um valor médio de 150 mg / dL (Figura 4). A partir de então este valor aumentou de forma constante, com pouca variabilidade entre os animais, enquanto que no grupo controle a glicose no sangue apresentou um valor constante com média aproximada de 79 mg / dL durante todo o período do experimento.

Quando todos os animais foram mortos, dez semanas após a indução, a glicemia foi de aproximadamente 350 mg / dL. Portanto coelhos tratados com aloxano permaneceram em uma condição de diabético, por pelo menos, dez semanas.



**Figura 4:** 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.

## Análise Morfológica

### *Túnica Albuginea*

A túnica albugínea (TA) é um tecido conjuntivo denso fibroelástico, e sua espessura total se apresentou significativamente aumentada em 88% ( $p < 0,0003$ ) em coelhos diabéticos quando comparados com os coelhos do grupo controle (tabela 1). Além disso, a organização dos componentes colágenos e fibrosos da TA se mostrou bastante alterada em animais diabéticos como revelado pela coloração do Picrosirius red observado sob

polarização (figura 5). Nas secções de tecido de coelhos diabéticos, houve uma mudança acentuada para birrefringência verde (figura 5B) em oposição ao predomínio de cor vermelho-alaranjado observada nos coelhos do grupo controle (figura 5A). Neste mesmo tecido, houve um aumento de 34% ( $p < 0.0001$ ) na densidade volumétrica das fibras do sistema elástico nos coelhos diabéticos quando comparados com os coelhos do grupo controle (tabela 1 e figura 6).

<b>Albugínea</b>		
	<b>Grupo Controle</b>	<b>Diabético</b>
<b>Fibras do sistema elástico (%)</b>	<b>11.10 ± 1.62</b>	<b>14.88 ± 1.17 (p &lt; 0.0001)</b>
<b>Espessura (mm)</b>	<b>0.26 ± 0.06</b>	<b>0.49 ± 0.15 (p &lt; 0.0003)</b>

Tabela 1: Densidade Volumétrica (Vv) das fibras do sistema elástico e espessura (mm) da túnica albugínea peniana em coelhos do grupo controle e diabéticos .

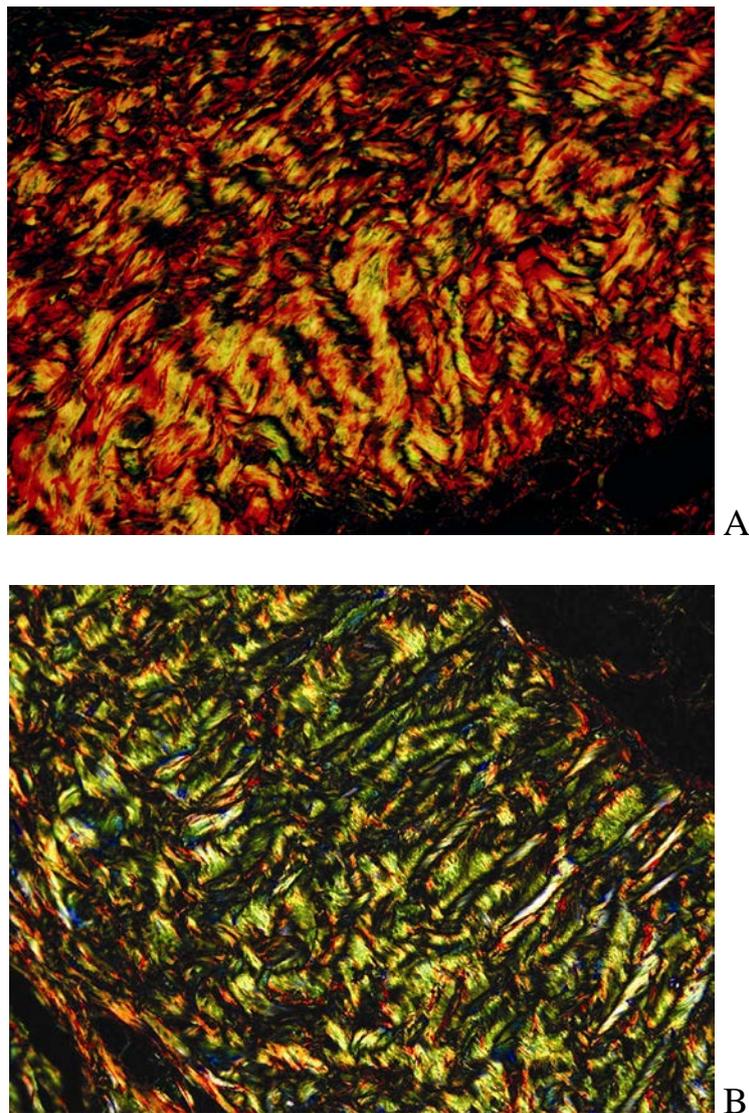


Figura 5: Fotomicrografias da túnica albugínea do pênis de coelho. A) Grupo controle. Verifica-se predominância de fibras de cor vermelho alaranjado. B) Grupo diabético com predominância de fibras de cor verde. Picrosirius red e observado sob polarização. X400.

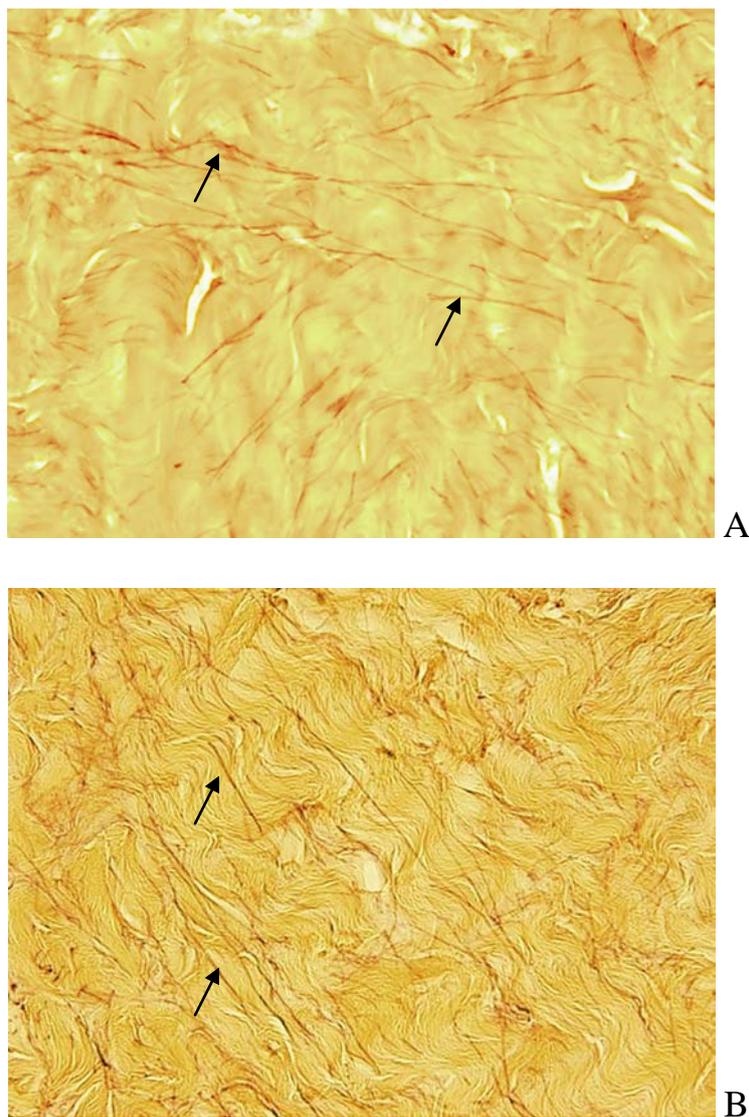


Figura 6: Fotomicrografias da túnica albugínea do pênis de coelho, evidenciando as fibras do sistema elástico (setas). A) Grupo controle. B) Grupo diabético. Observa-se em B um aumento da densidade volumétrica das fibras do sistema elástico. Fucsina-Resorcina de Weigert com prévia oxidação. X 400.

## **Tecido Erétil**

O corpo cavernoso (CC) e o corpo esponjoso (CE) do pênis foram afetados de maneira diferente pelo diabetes no que se refere ao conteúdo e organização estrutural dos principais componentes do tecido conjuntivo (figura 7). Sendo assim, no CC de coelhos diabéticos ocorreu uma diminuição de 45% ( $p < 0.0001$ ) na densidade volumétrica do colágeno quando comparados com os valores obtidos para o grupo controle (tabela 2). Esta mudança foi acompanhada por um discreto predomínio de birrefringência esverdeada observada nos cortes corados com o vermelho Picrosirius red visto ao microscópio de polarização (figura 7B), enquanto que nos cortes do grupo controle houve predomínio de birrefringência vermelho alaranjada (figura 7A).

No CC o diabetes provocou uma diminuição na densidade volumétrica nas fibras do sistema elástico em 46% ( $p < 0.0001$ ) (tabela 2 e figura 8).

Nos coelhos diabéticos houve um aumento de 40% ( $p < 0.0001$ ) na densidade volumétrica de músculo liso no CC (tabela 2, figuras 9B e 10B).

	Corpo Cavernoso		Corpo Esponjoso	
	Grupo Controle	Diabético	Grupo Controle	Diabético
<b>Células musculares lisas %</b>	<b>49.28 ± 2.14</b>	<b>68.77 ± 1.89</b> <b>(p &lt; 0.0001)</b>	<b>50.62 ± 1.91</b>	<b>31.24 ± 1.77</b> <b>(p &lt; 0.0001)</b>
<b>Colágeno %</b>	<b>25.79 ± 1.69</b>	<b>14.31 ± 1.54</b> <b>(p &lt; 0.0001)</b>	<b>32.06 ± 1.81</b>	<b>35.59 ± 1.70</b> <b>(p &lt; 0.0235)</b>
<b>Fibras do sistema elástico %</b>	<b>15.63 ± 2.33</b>	<b>8.46 ± 2.22</b> <b>(p &lt; 0.0001)</b>	<b>22.69 ± 1.29</b>	<b>24.40 ± 1.62</b> <b>(p &lt; 0.0025)</b>

Tabela 2: Densidade Volumétrica (Vv) das células musculares lisas, fibras colágenas e fibras do sistema elástico no corpo cavernoso e corpo esponjoso do pênis de coelhos do grupo controle e diabéticos .

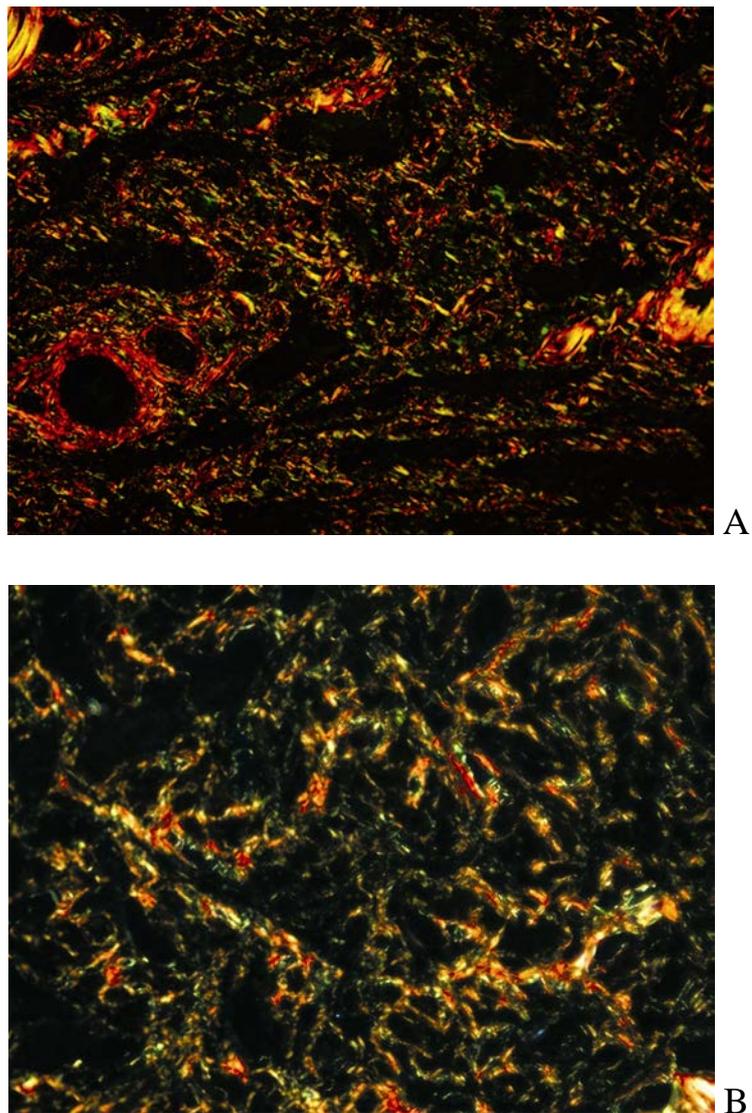


Figura 7: Fotomicrografias do corpo cavernoso do pênis de coelho. A) Grupo controle com predominância de fibras colágenas de cor vermelho alaranjado. B) Grupo diabético com discreto predomínio de fibras colágenas de cor verde. Picrosirius red observado sob polarização. X400.

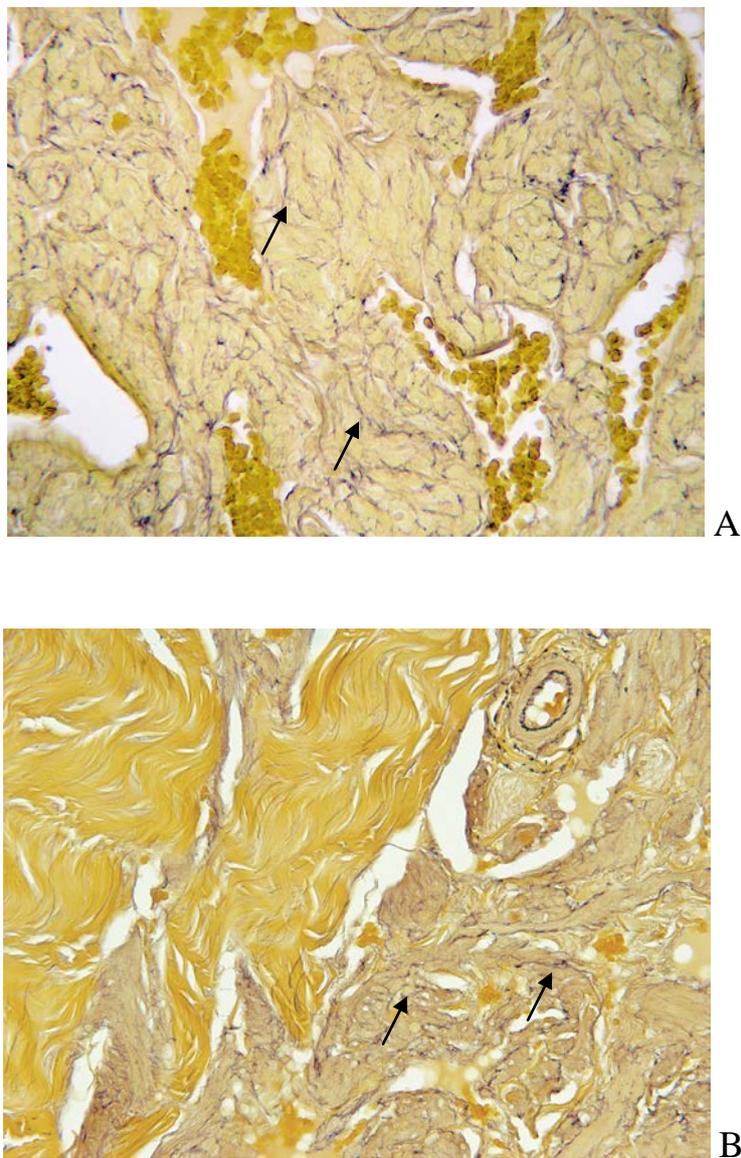


Figura 8: Fotomicrografias do corpo cavernoso do pênis de coelho evidenciando as fibras do sistema elástico (setas). A) Grupo controle. B) Grupo diabético com diminuição da densidade volumétrica das fibras do sistema elástico. Fucsina-Resorcina de Weigert com prévia oxidação. X400.

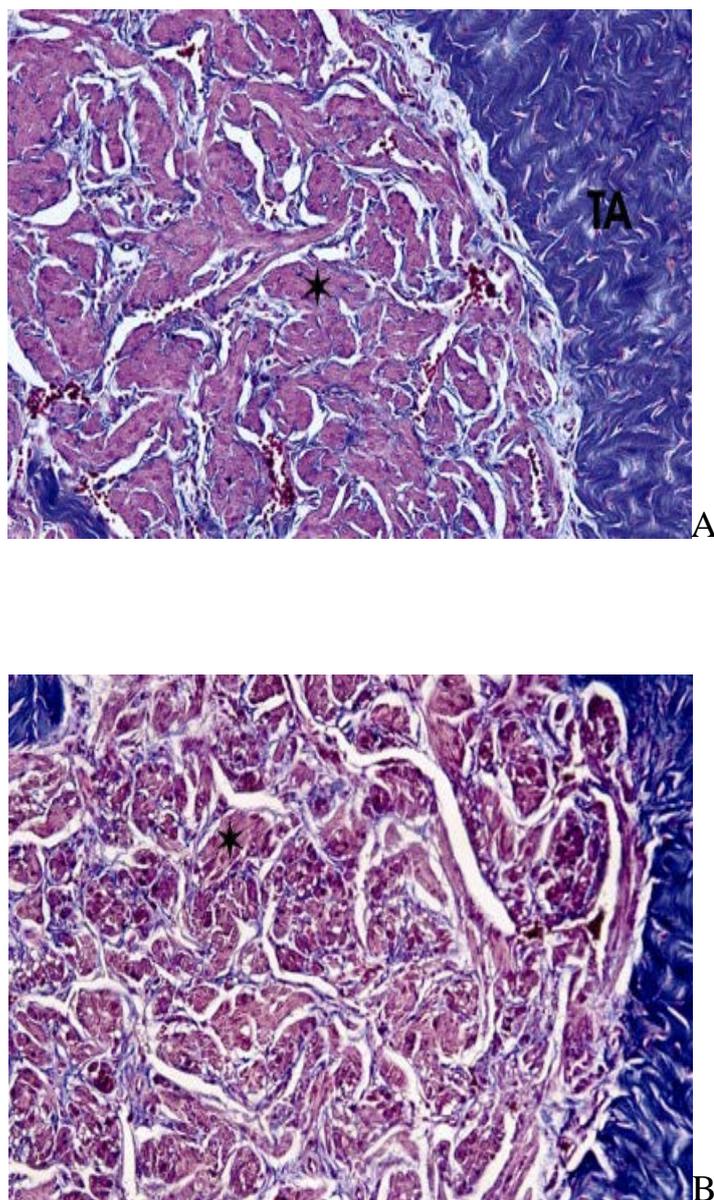


Figura 9: Fotomicrografias do corpo cavernoso do pênis de coelho. Fibras musculares lisas (★) e túnica albugínea (TA). A) Grupo controle. B) Grupo diabético com aumento na densidade volumétrica do músculo liso . Tricrômico de Masson. X 200.

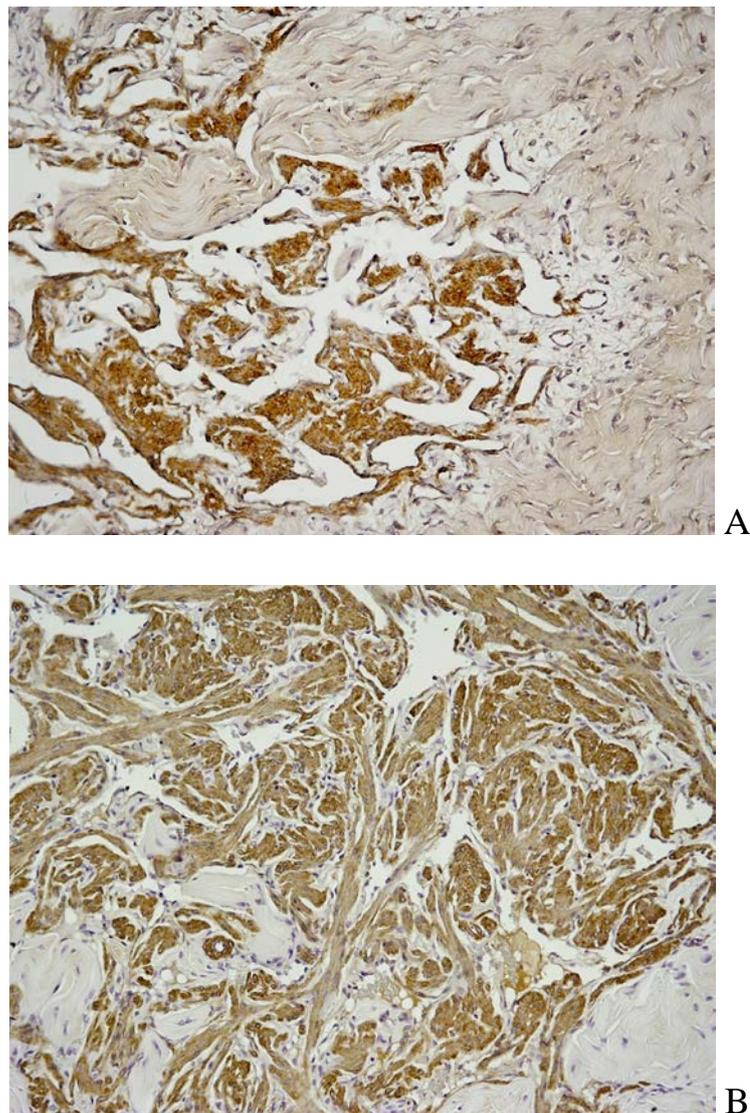


Figura 10: Fotomicrografias do corpo cavernoso do pênis de coelho. A) Grupo controle, B) Grupo diabético com aumento na densidade volumétrica do músculo liso. Imuno-histoquímica para alfa-actina. X 200.

Em contraste com o CC, no CE de coelhos diabéticos, a densidade volumétrica do colágeno aumentou em 11% ( $p < 0.0235$ ), e houve um aumento significativo da birrefringência verde (Figura 11B). Enquanto que no corpo cavernoso o diabetes provocou uma diminuição na densidade

volumétrica nas fibras do sistema elástico em 46% ( $p < 0.0001$ ), no corpo esponjoso esta condição conduziu a um aumento de 8% ( $p < 0.0025$ ) para o mesmo componente (tabela-2 e figura 12).

Nos coelhos diabéticos houve uma alteração na densidade volumétrica de músculo liso tanto no CC quanto no CE, mas de maneira oposta. Ou seja, no CE, uma diminuição de 38% ( $p < 0.0001$ ) (tabela 2, figuras 13B e 14B).

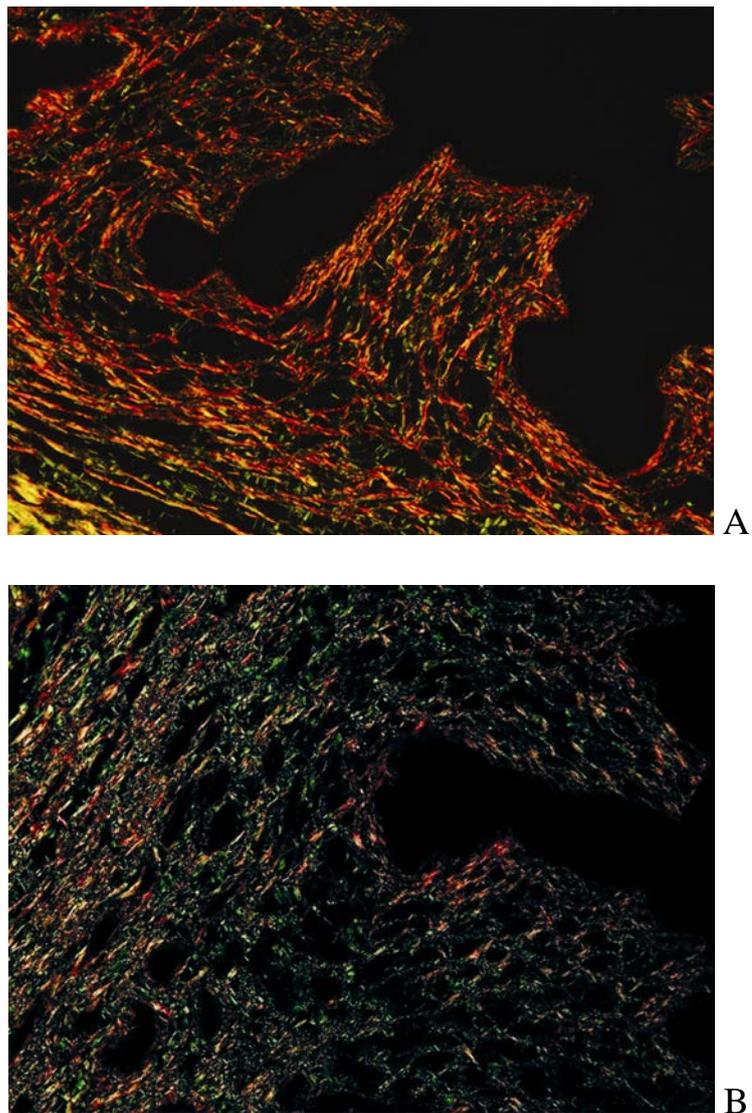


Figura 11: Fotomicrografias do corpo esponjoso do pênis de coelho. A) Grupo controle com predominância de fibras de cor vermelho alaranjado. B) Grupo diabético com predominância de fibras de cor verde. Picrosirius red observado sob polarização. X 400.

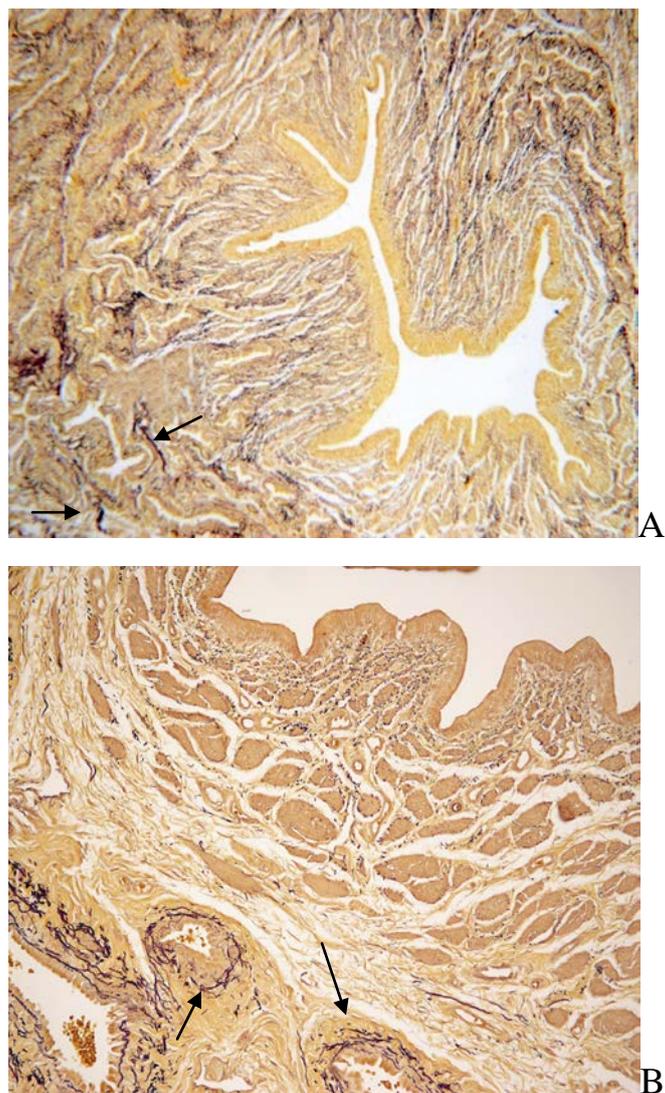


Figura 12: Fotomicrografias do corpo esponjoso do pênis de coelho evidenciando as fibras do sistema elástico (setas). A) Grupo controle. B) Grupo diabético com um aumento da densidade volumétrica das fibras do sistema elástico. Fucsina-Resorcina de Weigert com prévia oxidação. X 400.

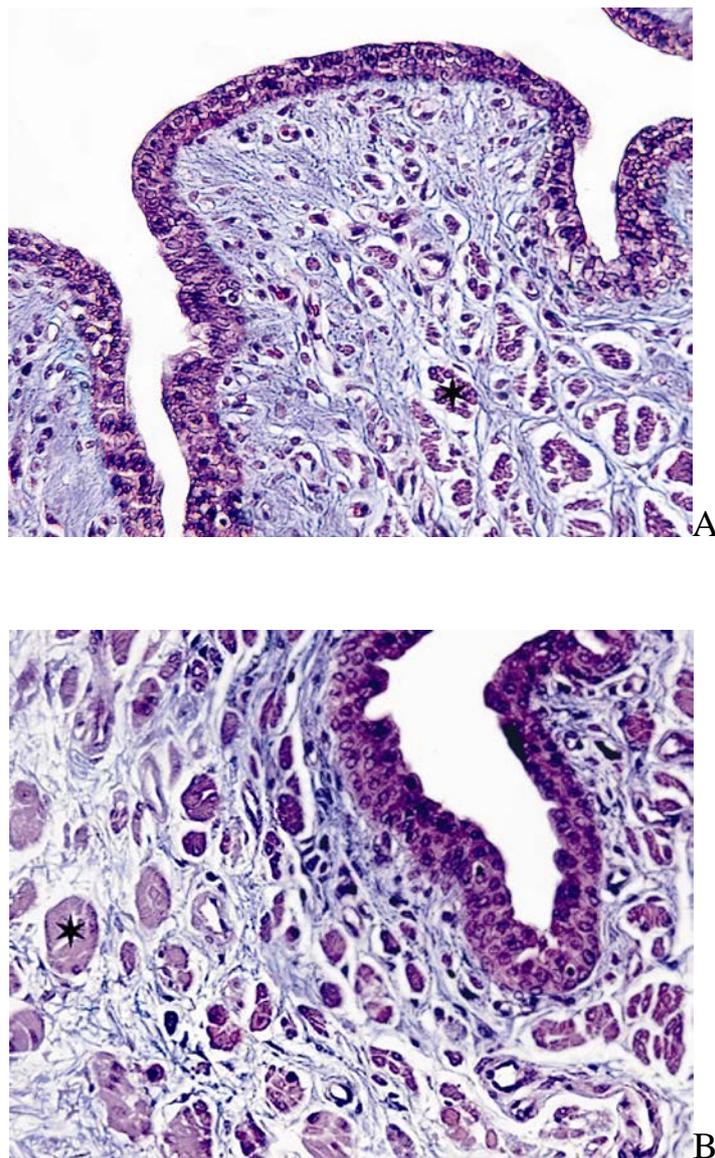


Figura 13: Fotomicrografias do corpo esponjoso do pênis de coelho. Fibras musculares lisas (★). A) Grupo controle e B) Grupo diabético com diminuição na densidade volumétrica do músculo liso. Tricrômico de Masson. X 200.

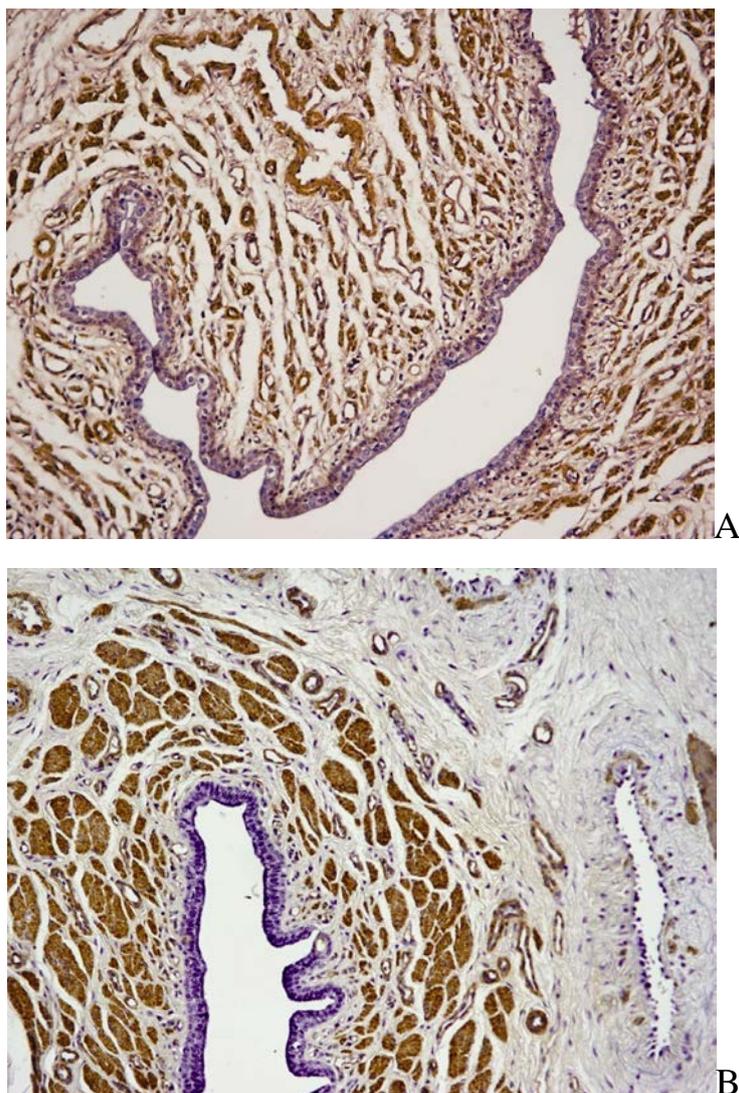


Figura 14: Fotomicrografias do corpo esponjoso do pênis de coelho. A) Grupo controle, B) Grupo diabético com diminuição na densidade volumétrica do músculo liso. Imuno-histoquímica para alfa-actina. X 200.

## **5 - DISCUSSÃO**

## 5 – DISCUSSÃO

Aproximadamente a metade dos homens diabéticos que não fazem nenhum tipo de controle ou tratamento apresentam problemas de DE [46, 11, 13]. Em nosso trabalho as modificações observadas no pênis dos animais diabéticos tanto na TA, no CC quanto no CE nos leva a estabelecer uma possível associação com a DE.

A diabete, quimicamente induzida em animais, tem sido empregada para a compreensão das alterações causadas por esta enfermidade em diferentes órgãos, pois permite controlar numerosas variáveis que não podem ser obtidas em estudos com seres humanos. O trabalho procurou mostrar o efeito da diabete no pênis de coelho que é do tipo vascular semelhante ao humano e por isso freqüentemente utilizado como modelo em diferentes estudos [39, 24]. No caso da DE sabe-se que a diabete está preferencialmente associada às alterações endoteliais [10]. No entanto a DE é multi fatorial envolvendo também a participação das fibras musculares lisas, colágeno e fibras do sistema elástico, que constituem juntamente com outros elementos o substrato morfológico. Entretanto estes fatores ainda não são completamente conhecidos. O estudo procurou, portanto caracterizar de forma qualitativa e quantitativa as modificações que ocorrem nesses elementos do pênis de coelhos diabéticos.

Uma das características da matriz extracelular e de seus componentes é a sua adaptabilidade em resposta às mudanças do meio e a diferentes estímulos [47]. A caracterização e a quantificação dos elementos fibrosos da matriz extracelular já demonstraram ser um método eficaz para a avaliação de alterações morfológicas e funcionais associadas a condições patológicas em humanos e diversos modelos animais [48, 24, 49, 50]. No caso específico do pênis uma alteração em qualquer um de seus componentes pode afetar a resposta do tecido erétil [51]. O colágeno e as

fibras elásticas são as principais estruturas do tecido complacente do pênis que permite o aumento na circunferência e comprimento durante intumescência proporcionando ao mesmo tempo adequada recuperação para retornar rapidamente ao estado flácido durante detumescência [52,53].

Colágenos I e III são colágenos fibrilares intersticiais e são os tipos mais abundantes de colágeno. Eles são importantes no processo da fibrose em diferentes órgãos acometidos pela diabete [47]. No pênis dos coelhos diabéticos o comportamento do colágeno em resposta à doença foi diferente de acordo com o local analisado, ou seja, corpo cavernoso e corpo esponjoso. Em relação ao corpo cavernoso houve uma diminuição de 44% nos indivíduos diabéticos mostrando que a doença provoca uma modificação significativa na quantidade de colágeno o que poderia contribuir e explicar, em parte, o aparecimento da DE. No CE, de forma diferente, ocorreu um aumento de aproximadamente 11% do colágeno. O aparecimento de modificações diferentes em regiões diferentes do pênis motivadas pela mesma causa ocorre também em outras situações como no caso do priapismo onde a glândula, que é essencialmente corpo esponjoso, se comporta de maneira diferente do CC do pênis [54, 55, 56]. As modificações causadas pela diabete parecem afetar não somente o aspecto quantitativo como também o aspecto qualitativo do colágeno. A caracterização de diferentes tipos de colágeno mostrada através de cortes corados pelo Picrosirius red e observado sob luz polarizada mostrou que no grupo controle existe uma predominância da cor vermelha e nos indivíduos diabéticos a predominância é da cor verde tanto no corpo cavernoso quanto no corpo esponjoso indicando que nos indivíduos diabéticos ocorreu uma alteração na síntese do colágeno e o aparecimento em maior quantidade de outro tipo de colágeno, possivelmente o colágeno tipo III. Uma alteração no tipo predominante de colágeno parece ocorrer em outros órgãos nos indivíduos diabéticos. Vranes [57] em experimento

realizado com ratos diabéticos e utilizando também a técnica do Picrosirius red observou que na artéria mesentérica cranial também houve um predomínio da birrefringência verde, compatível com o colágeno tipo III.

As fibras elásticas são estabilizadoras do colágeno e se caracterizam pela extensibilidade e elasticidade visto que uma das propriedades da elastina é promover o suporte e a elasticidade [58, 59]. Alterações na arquitetura das fibras elásticas e conseqüente perda da função são características patológica encontradas em uma série de doenças degenerativas e inflamatórias [60].

O local e arranjo das fibras estão relacionados à funcionalidade e refletem propriedades mecânicas locais do tecido [58, 27, 61]. Tecidos que são constantemente submetidos à tensão de estiramento são ricos em fibras do sistema elástico [59, 61, 62]. Apesar da importância das fibras do sistema elástico no pênis de indivíduos diabéticos, são poucos os trabalhos que caracterizaram de forma precisa esse componente da MEC e sua possível alteração na diabete. Em coelhos adultos jovens a densidade volumétrica de fibras do sistema elástico no corpo cavernoso é grande - 15%, se comparada aos 9% do volume do corpo cavernoso do homem [63, 62] e mais ainda ao de ratos adultos jovens cujos valores são cerca de 5% [64]. Este dado parece indicar o papel importante que estas fibras exercem no pênis de coelho. No coelho diabético houve uma diminuição significativa de aproximadamente 7% no corpo cavernoso e um aumento de 9% no corpo esponjoso. As observações dos elementos fibrosos da matriz extracelular mostram que enquanto estes elementos diminuem no corpo cavernoso eles aumentam no corpo esponjoso caracterizando um comportamento específico nas diferentes regiões analisadas.

A diminuição no relaxamento das fibras musculares lisas ou alteração em sua densidade no corpo cavernoso pode representar a base estrutural para o aparecimento da disfunção erétil [65, 66, 67].

A DM esta associada à diminuição do relaxamento nas fibras musculares lisas e ao desenvolvimento da disfunção erétil [13].

As fibras musculares aumentaram significativamente, aproximadamente 40%, no corpo cavernoso. Esse aumento das fibras musculares lisas na diabetes foi observado em outros órgãos do sistema urogenital como na bexiga onde as fibras musculares se apresentavam hipertrofiadas [68, 69]. Nos vasos sanguíneos este aumento também foi observado [70, 57, 71]. O aumento significativo das fibras musculares no corpo cavernoso do pênis poderia acarretar uma diminuição nos espaços sinusoidais explicando, em parte, a DE observada nesses pacientes. Da mesma forma como ocorre com os elementos fibrosos da matriz extracelular a ação da diabetes em relação às fibras musculares comporta-se de forma diferente no corpo esponjoso e no corpo cavernoso onde ocorre um aumento significativo de 39% em comparação ao corpo esponjoso onde ocorre uma diminuição significativa de 38%.

As células musculares lisas apresentam grande variabilidade fenotípica [72], e as células de diferentes tecidos podem ter diferentes perfis sintéticos podendo, inclusive, responder de forma diferente para o mesmo fator de estímulo ou inibição. Por exemplo, a hipercolesterolemia induz a uma redução acentuada na quantidade de células musculares lisas no corpo cavernoso do rato [23], mas esta mesma condição em artérias estimula a proliferação das células musculares lisas [73]. Assim, essa variabilidade fenotípica das células musculares lisas poderiam explicar, pelo menos em parte, os efeitos opostos do diabetes sobre essas células no corpo cavernoso e esponjoso assim mostrado pelos nossos resultados. Como as células musculares lisas são a principal fonte de moléculas de matriz extracelular no tecido erétil, a heterogeneidade dessas células podem também fundamentar as diferentes respostas observadas no corpo

cavernoso e esponjoso em relação às fibras colágenas e do sistema elástico em animais diabéticos.

A túnica albugínea é uma bainha fibroelástica que circunda o músculo liso trabecular dos corpos cavernosos e é composta principalmente de feixes espessos de colágeno e fibras do sistema elástico. Existem poucos relatos sobre as alterações morfológicas da TA na diabetes; e seu envolvimento preciso na disfunção erétil, induzida pela diabetes ainda não está bem esclarecida [74].

Salama et al [75] avaliaram as mudanças ultra-estruturais da TA peniana em ratos Zucker Diabetic Fatty (diabetes tipo 2), em microscopia eletrônica de varredura. Concluíram que com a progressão da doença em torno de 40 semanas de duração, houve um aumento da espessura da TA peniana acompanhado por uma perda de ondulação dos feixes de colágeno.

Wei & Chang [76] através da indução da diabetes mellitus em ratos com streptozitocina observaram um decréscimo da densidade das fibras elásticas na albugínea peniana. No presente trabalho foi observado um aumento significativo de 4% na densidade volumétrica das fibras do sistema elástico na albugínea dos coelhos grupo diabético, aumento significativo na espessura da túnica albugínea e modificações qualitativas do colágeno. Lu et al [74] induziram diabetes em ratos utilizando streptozitocina, e compararam as medidas de espessura da túnica albugínea de ratos diabéticos com os valores do grupo controle e verificaram que ocorreu uma diminuição da espessura da túnica albugínea nos animais diabéticos. No entanto, estas medidas foram feitas em preparações de tecidos desidratados, de modo que a espessura TA poderia estar artificialmente diminuída. Essas modificações observadas poderiam comprometer os aspectos funcionais da túnica e atuar como mais um fator no aparecimento da disfunção erétil.

## **6 - CONCLUSÕES**

## 6 – CONCLUSÕES

A diabetes tipo II induzida experimentalmente por aloxano, causa modificações importantes nos diferentes elementos constituintes do pênis do coelho. Na túnica albugínea promoveu aumento da espessura e na densidade volumétrica nas fibras do sistema elástico, e alterações qualitativas no colágeno. No corpo cavernoso ocorreu diminuição na densidade volumétrica das fibras do sistema elástico e colágeno, e aumento da densidade volumétrica do músculo liso. No corpo esponjoso a diabetes provocou aumento na densidade volumétrica nas fibras do sistema elástico e colágeno e diminuição na densidade volumétrica do músculo liso.

As alterações morfológicas encontradas em nosso estudo sugerem que a diabetes pode levar ao desenvolvimento da disfunção sexual erétil.

## **7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Colberg S, Swain D. Exercise and Diabetes Control. A Winning Combination. *The Physician and Sports Medicine*. 2000; 28 (4): 216-218.
2. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, 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 (11): 3160-7.
3. Stumvoll M, Goldstein BJ, Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005; 365 (9467): 1333-46.
4. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree S, King H. Global prevalence of diabetes – Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27: 1047-53.
5. World Health Organization. *The World Health Report 2003*. Geneva: World Health Organization; 2003.
6. Bosi PL. 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 (6): 726-732.

7. Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH, Steffes MW. American Diabetes Association. Nephropathy in diabetes (Position Statement). *Diabetes Care*. 2004; 27(Suppl. 1): 79-83.
8. Boulton AJM, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet*. 2005; 366 (9498): 1719-24.
9. Vickers MA, Wright EA. Erectile dysfunction in the patient with diabetes mellitus. *Am J Manag Care*. 2004; 10(1 Suppl ): 3–11.
10. Musicki B, Burnett AL. Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 2007; 19 (2): 129-38.
11. Burke J P, Jacobson DJ. Diabetes and Sexual Dysfunction: Results From the Olmsted County Study of Urinary Symptoms and Health Status Among Men. *The Journal of Urology*. 2007; 177: 1438-1442.
12. Moore CR, Wang R. Pathophysiology and treatment of diabetic erectile dysfunction. *Asian J Androl*. 2006; 8(6): 675-84.
13. Chitale K. Type 1 and Type 2 diabetic-erectile dysfunction: same diagnosis (ICD-9), different disease? *J Sex Med*. 2009; 6 (Suppl 3): 262-8.
14. Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, Derby CA, Kleinman KP and McKinlay JB: Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69

- years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Urol*. 2000; 163: 460-3.
15. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras*. 2004; 19(1): 59-65.
  16. Traish AM, Munarriz R, O'Connell L, Choi S, Kim SW, Kim NN, Huang YH, Goldstein I. Effects of medical and surgical castration on erectile function in an animal model. *J Androl*. 2003; 24: 381–387.
  17. Traish AM, Toselli P, Seong-Joo J, Noel NK. Adipocyte Accumulation in Penile Corpus Cavernosum of the Orchiectomized Rabbit: A Potential Mechanism for Veno-occlusive Dysfunction in Androgen Deficiency. *Journal of Andrology*. 2005; 26 (2): 242-248.
  18. Bozkurt NB, 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(1): 71-8.
  19. Nickel R, Schummer A, Seiferle E: The anatomy of the domestic animals. 1. ed. Berlin. Hamburg: Editora Verlag Paul Parey. 1979; vol. 3, p. 78.
  20. Hafez, B: Reprodução Animal. Rio de Janeiro, Manole. 2004, p. 277.

21. Dukes: *Fisiología dos Animais Domésticos*. 11ª edição, Rio de Janeiro – Editora Guanabara Koogan S.A. 1996, p. 57.
22. Qiu Y, Kraft P, Lombardi E, Clancy J. Rabbit corpus cavernosum smooth muscle shows a different phosphodiesterase profile than human corpus cavernosum. *J. Urol.* 2000;164: 882–886.
23. Yesilli C, Yaman O, Anafarta K: Effect of experimental hypercholesterolemia on cavernosal structures. *Urology* 2001; 57 (6): 1184-1188.
24. Maia RS, Babinski MA, Abidu - Figueiredo M, Chagas MA, Costa WS, Sampaio FJB. Concentration of elastic system fibers in the corpus cavernosum, corpus spongiosum, and tunica albuginea in the rabbit penis. *Int J Impot Res.* 2006; 18(2):121-5.
25. Ozgel O, Dursun N, Cengelci A, Ates S. Arterial supply of the penis in the New Zealand rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.). *Anat Histol Embryol.* 2003; 32(1): 6-8.
26. Ross MH, Romrell LJ: *Histologia texto e atlas*. São Paulo, Editora Médica Panamericana. 1993; p. 34.
27. Hay ED. *Cell Biology of extracellular matrix*. New York, Plenum Press. 1991; p. 53.

28. Van de Rest, M. and Garrone, R: Collagen family of proteins. *Faseb J.* 1991; 5: 2814-2823.
29. Kadler KE, Hill A, Canty-Laird, E.G. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol.* 2008; 20(5):495-501.
30. Cormack, D.H. *Ham's Histology.* Philadelphia, J. B. Lippincott Company. 1987, p. 43.
31. Junqueira LC, Carneiro J: *Histologia básica.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004, p. 135.
32. Cotta-Pereira G. Contribuição ao estudo das fibras do Sistema Elástico. Tese (Concurso Professor Titular) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1984.
33. Mecham RP, Heuser JE: The Elastic Fiber. In: *Cell Biology of Extracellular Matrix.* Mecham, Plenum Press, 1991. pp. 47-52.
34. Ross LL, Bornstein MB. An electron microscopic study of synaptic alterations in cultured mammalian central nervous tissues exposed to serum from animals with experimental allergic encephalomyelitis. *Lab Invest.* 1969; 20(1): 26-35.
35. Gawlik Z. Morphological and morphochemical properties of the elastic system in the motor organ of a man. *Folia. Histochem. Cytochem.* 1965; 3 : 233-37.

36. Fullmer HM: A comparative histochemical study of elastic, pre – elastic and oxitalan connective tissue fibers. *J. Histochem. Cytochem.* 1960; 3: 233-35.
37. Gartner LP; Hiatt JL. *Tratado de histologia em cores.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1999; p. 28.
38. Henrikson RC; Kaye GI; Mazurkiewicz JE. *Histologia.* 1. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999; p. 44.
39. Simopoulos DN, Gibbons SJ, Malysz J, Szurszewski JH, Farrugia G, Ritman EL, Moreland RB, 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(5): 1776-82.
40. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 379-94.
41. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereology in the normal and pathological morphologic research. *Biomed Res.* 1998; 9: 153-163.
42. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Ciênc.* 2003; 75(4): 469-486.
43. Bancroft JD, Cook HC. *Manual Of Histological Techniques And Their Diagnostic Application.* Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994, p. 69.

44. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11: 447-455.
45. Weibel ER, Kistler GS, Escherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell Biol.* 1966; 30: 23-38.
46. Christ GJ, Hsieh Y, Zhao W, Schenk G, Venkateswarlu K, Wang HZ, Tar MT, Melman A. Effects of streptozotocin-induced diabetes on bladder and erectile (dys)function in the same rat in vivo. *BJU Int.* 2006; 97(5): 1076-82.
47. Hayden M R; James RS, Tyagi SC. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. *Cardiovascular Diabetology.* 2005; 4 (9): 1-20.
48. Fani K, Lundin AP, Beyer MM. Pathology of the penis in long-term diabetic rats. *Diabetologia,* 1983; 25: 424-28.
49. Siracusano S, Bosinco L, Marras V. Preliminary reports on morphological and ultrastructural changes in the corpora cavernosa of the rat after chronic arterial obstruction. *Arch Esp Urol.* 1996; 49: 191-95.

50. Babinski MA, de Brito-Gitirana L, Chagas MA, Abidu-Figueiredo M, Costa WS, Sampaio FJ. Immunohistochemical analysis of smooth muscle cells and volumetric density of the elastic system fibers of wild boar (*Sus scrofa*) penis. *Anim Reprod Sci.* 2005; 86(3-4): 317-28.
  
51. Sáenz de Tejada I, Angulo J, Cellek S, González-Cadavid N, Heaton J, Pickard R, Simonsen U. Pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med.* 2005; 2(1): 26-39.
  
52. Hsu GL, Brock G, von Heyden B, Nunes L, Lue TF, Martinez-Pineiro L. The three-dimensional structure of the tunica albuginea: anatomical and ultrastructural levels. *Int J Impot Res* 1992; 4: 117-29.
  
53. Hsu GL, Brock G, VonHeyden B, Nunes L, Lue TF, Tanagho EA. The distribution of elastic fibrous elements within the human penis. *BJU Int.* 1994; 73: 566–571.
  
54. Van der Horst C, Stuebinger H, Seif C, Melchior D, Martínez-Portillo FJ, Juenemann KP. Priapism - etiology, pathophysiology and management. *Int Braz J Urol.* 2003; 29: 391-400.
  
55. Tazi I. Priapism as the first manifestation of chronic myeloid leukemia. *Ann Saudi Med.* 2009; 29: 412.

56. Costa WS, Felix B, Cavalcanti AG, Medeiros Jr J, Sampaio FJB. Structural analysis of the corpora cavernosa in patients with ischaemic priapism. *BJU Int*. 2009 Sep 14. [Epub ahead of print]
57. Vranes D, Cooper ME, Dilley RJ. Cellular mechanisms of diabetic vascular hypertrophy. *Microvasc Res*. 1999; 57(1): 8-18.
58. Cotta-Pereira G, Guerra RF, Bittencourt-Sampaio, S., Oxytalan, elaunin and elastic fibers in the human skin. *J. Invest. Dermatol*. 1976; 66: 143–148.
59. Kreis T, Vale R. *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*. Oxford University Press. 1993; pp. 40–51.
60. Lewis KG et al. Acquired disorders of elastic tissue: Part II. decreased elastic tissue. *J Am Acad Dermatol*. 2004; 51: 165-185.
61. Haralson MA, Hanssel JR. *Extracellular Matrix: A Practical Approach*. Oxford University Press. 1995; pp. 1–20.
62. Bastos AL, Costa WS, Sampaio FJB. Concentration of elastic fibers in the male urethra during human fetal development. *BJU Int*. 2004; 94: 620–623.
63. Sattar AA, Wespes E, Schulman CC: Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. *Eur Urol* 1994; 25: 142–144.

64. Pinheiro ACAD, Costa WS, Cardoso LEM, Sampaio FJB. 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.
65. Lue TF, Tanagho E A: Physiology of erection and pharmacological management of impotence. *J. Urol.* 1987; 137 (5): 829- 36.
66. Krane RJ, Goldstein I, Saenz de Tejada I. Impotence. *New Engl. J. Med.* 1989; 321 (24): 1648- 59.
67. Campbell's Urology. CD-Rom Walsh, Retik, Vaughan, Wein Copyright © 2003, Elsevier Science (USA). All rights reserved.
68. Lincoln J, Haven AJ, Sawyer M, Burnstock G. The smooth muscle of rat bladder in the early stages of streptozotocin-induced diabetes. *Br J Urol.* 1984; 56(1): 24-30.
69. Uvelius B. Detrusor smooth muscle in rats with alloxan-induced diabetes. *J Urol.* 1986; 136(4): 949-52.
70. Hadcock S, Richardson M, Winocour P, Hatton MWC. Intimal alterations in the first 6 months of alloxan-induced diabetes. *Arterioscler Thromb.* 1991; 11: 517-529.
71. Jandeleit- Dahm K, Hannan KM, Farrelly CA, Allen TJ, Rumble JR, Gilbert RE, Cooper ME, Little PJ. 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 (12): 1133 - 1140.
72. Van Oostrom O, Fledderus JO, Kleijn D, Pasterkamp G, Verhaar MC. Smooth muscle progenitor cells: friend or foe in vascular disease? *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009; 4 (2): 131-40.
73. Badimon L, Martínez-González J, Llorente-Cortés V, Rodríguez C, Padró T. Cell biology and lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Mol Med.* 2006; 6 (5): 439-56.
74. Lu YL, Shen ZJ, Wang H, Chen SW, Zhou XL, Chen ZD. Ultrastructural changes of penile tunica albuginea in diabetic rats. *Asian J Androl.* 2004; 6(4): 365-8.
75. Salama N, Kagawa S. Ultra-structural changes in collagen of penile tunica albuginea in aged and diabetic rats. *Int J Impot Res.* 1999; 11(2): 99-105.
76. Wei AY, Cheng Y, Li YG. Effect of elastic fiber alterations in the tunica albuginea of the penis on erectile function of diabetic rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2007; 27(3): 276-8.

## **8 - ANEXOS**