



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Bruno Felix Patrício

**Análise estrutural do corpo cavernoso de pacientes com
priapismo isquêmico**

Rio de Janeiro

2009

Bruno Felix Patrício

Análise estrutural do corpo cavernoso de pacientes com priapismo isquêmico

Dissertação apresentada, como requisito parcial,
para a obtenção do título de Mestre, ao Programa
de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências
Cirúrgicas,

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Barcelos Sampaio

Rio de Janeiro

2009

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

P314 Patrício, Bruno Felix.

Análise estrutural do corpo cavernoso de pacientes com priapismo isquêmico / Bruno Felix Patrício. – 2009.
33f.

Orientador: Waldemar Silva Costa.

Coorientador: Francisco José Barcelos Sampaio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Disfunção erétil - Teses 2. Priapismo – Teses. I. Costa, Waldemar Silva. II. Sampaio, Francisco José Barcelos. III. Título.

CDU 616.692

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

Assinatura

Data

Bruno Felix Patrício

Análise estrutural do corpo cavernoso de pacientes com priapismo isquêmico

Dissertação apresentada, como requisito parcial, para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Barcelos Sampaio.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2009.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa (Orientador)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof.^a Dra. Cristiane da Fonte Ramos
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof. Dr. Marcio Antônio Babinski
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Rio de Janeiro

2009

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. André Cavalcante chefe do Serviço de Urologia do Hospital Souza Aguiar pelo material cirúrgico estudado nesse trabalho.

Ao pós-graduando da Unidade de Pesquisa Urogenital, Jorge Medeiros pela realização da técnica de imunohistoquímica.

Ao pós-graduando da Unidade de Pesquisa Urogenital João Pedro Rosado pelos dados relativos às amostras.

RESUMO

PATRÍCIO, Bruno Félix. *Análise estrutural do corpo cavernoso de pacientes com priapismo isquêmico*. 2009. 33 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

O objetivo do presente trabalho é avaliar através de métodos quantitativos e qualitativos, as alterações nos corpos cavernosos de indivíduos com priapismo isquêmico. Foram estudados fragmentos de corpos cavernosos obtidos por biópsia de sete pacientes com, pelo menos, 48 horas de priapismo isquêmico, com idade entre 27 e 44 anos (média de 38 anos). Os pacientes foram submetidos a tratamento cirúrgico pela técnica de Al-ghorab. O material foi submetido a técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas para a caracterização e quantificação do músculo liso e dos elementos fibrosos do tecido conjuntivo. A análise do corpo cavernoso dos pacientes com priapismo e do grupo controle, mostrou os seguintes resultados: Colágeno: controle = 34.76 ± 4.64 , priapismo = 39.64 ± 2.91 ($p = 0.0019$); sistema elástico: controle 28.10 ± 2.85 , priapismo 36.10 ± 3.06 ($p = 0.0012$) fibras musculares: controle = 43.37 ± 4.96 , priapismo = 26.48 ± 5.00 ($p < 0.0001$). Ficou caracterizado aumento estatisticamente significativo dos elementos fibrosos do tecido conjuntivo e diminuição significativa nas fibras musculares lisas do corpo cavernoso dos pacientes com priapismo isquêmico. O presente estudo mostrou que o priapismo isquêmico está associado a alterações significativas nos componentes da matriz extracelular e na musculatura lisa do corpo cavernoso. Esses resultados poderiam explicar a disfunção erétil que acompanha os pacientes com priapismo isquêmico.

Palavras-chave: pênis; priapismo; disfunção erétil; músculo liso; matriz extracelular; quantificação/estereologia

ABSTRACT

The purpose of the present study was to evaluate through quantitative and qualitative methods, the changes in the corpora cavernosa of patients with ischemic priapism. We obtained samples of corpora cavernosa from 7 patients with ischemic priapism, aged between 28 and 44 years (mean = 38), who underwent a cavernosal-glandular shunt. The control tissues were fragments of corpora cavernosa obtained from autopsies of 7 age-matched men who died of causes not related to the urogenital tract. Histochemical and immunohistochemical techniques were used to assess and quantify the extra-cellular matrix and smooth muscle fibers. The volumetric density of smooth muscle, elastic fibers and collagen were determined in corpora cavernosa. The stereological analysis showed the following values of volumetric density in the structures studied. Collagen: controls = 34.76 ± 4.64 , priapism = 39.64 ± 2.91 ($p = 0.0019$); elastic system fibers: controls 28.10 ± 2.85 , priapism 36.10 ± 3.06 ($p = 0.0012$), smooth muscle fibers: controls = 43.37 ± 4.96 , priapism = 26.48 ± 5.00 ($p < 0.0001$). Our results demonstrated a significant increase in the fibrous elements of the connective tissue and a significant decrease of smooth muscle fibers in the corpora cavernosa of patients with ischemic priapism, when compared to controls. As conclusion, this study showed that ischemic priapism is associated with early significant changes in the components of the extra cellular matrix and smooth muscle fibers of corpora cavernosa. This could explain the frequent occurrence of erectile dysfunction found in patients with ischemic priapism.

Keywords: penis; priapism; erectile dysfunction; smooth muscle; extracellular matrix; stereology/quantification

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Morfologia	2
1.1.1	<u>Anatomia</u>	2
1.1.2	<u>Histologia</u>	4
1.1.2.1	Matriz extracelular	5
1.1.2.2	Fibras Musculares lisas	7
1.1.2	<u>Fisiologia da Ereção</u>	8
1.1.3	<u>Priapismo</u>	10
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	14
3	MATERIAL E MÉTODO	15
4	RESULTADOS	18
5	DISCUSSÃO	21
6	CONCLUSÃO	24
7	REFERÊNCIAS	25
	ANEXO A – Termo de consentimento informado	32
	ANEXO B – International Journal of Impotence Research	33
	ANEXO C – Journal of Radiation Research	34
	ANEXO D – Structural Analysis of the Corpora Cavernosa in Patients with Ischemic Priapism	35
	ANEXO E – Short-term effects of radiation on the density and structural organization of smooth muscle and connective tissue in the corpus cavernosum of rats supplemented with l-glutamine	53

1 INTRODUÇÃO

O nome priapismo tem sua origem no deus Príapo da mitologia grega. Príapo foi caracterizado por possuir um longo falus em ereção. Na mitologia grega, era filho de Dionísio e Afrodite, de Baco e de Venus na mitologia romana. É considerado o deus da fertilidade, dos vinhedos, dos rebanhos, dos pescadores, dos jardins, simbolizando a energia fecundante. Por ciúmes, ou por sentir-se ultrajada pela promiscuidade de Afrodite, Hera fez Príapo nascer com alguns exageros como, por exemplo, os genitais enormes. Conhecido em Roma com o nome de Facinum, ficou muito popular em Pompéia, onde é retratado trajando um longo vestido que deixa à mostra seu órgão genital (Figura 1).



Fig. 1 – Afresco da Imagem de Priapus, na Casa dos Vetti, Pompeia

O Priapismo foi descrito pela primeira vez por Tripe (1845) como sendo uma ereção prolongada, frequentemente dolorosa, que pode ou não ser desencadeado por um estímulo sexual. Esta doença atinge apenas os corpos cavernosos, não afetando o corpo esponjo e a glândula, o que facilita o seu diagnóstico (Adeyolu *et al.* 2002, Yuan *et al.* 2008).

1.1 Morfologia do Pênis

1.1.1 Anatomia macroscópica

O pênis é um órgão que faz parte de dois sistemas: sistema urinário e sistema reprodutor. É o órgão de cópula masculino, composto por três corpos cilíndricos de estrutura erétil: um par de corpos cavernosos, situados dorsalmente e um corpo esponjoso, situado ventralmente além de fâscias, nervos e vasos, todos recobertos pela pele. A maior parte do pênis é formada pelos corpos cavernosos, os quais se originam na sínfise púbica. Correm lado a lado separados por um septo incompleto e estão envolvidos intimamente pela túnica albugínea. Anterior aos corpos cavernosos está localizado o corpo esponjoso, que abriga no seu interior a uretra e possui duas dilatações: uma proximal, o bulbo esponjoso e outra distal, a glândula do pênis. Os três corpos de estrutura erétil estão envoltos por uma camada de tecido fibroso, a túnica albugínea, que varia em espessura tornando-se mais delgada ao envolver o corpo esponjoso. Além da túnica albugínea as três estruturas apresentam duas fâscias: a fâscia Buck ou profunda e a fâscia Dartos, também conhecida como túnica Dartos ou superficial. A derme e a epiderme recobrem estas estruturas (Gray *et al.* 1988, Latarjet *et al.* 1993, Brooks 2002) (Figura 2).



Figura 2 - Corte transversal do pênis humano normal (Sampaio, F. J. B.).

As artérias que suprem os corpos eréteis são as artérias do bulbo do pênis e artéria dorsal do pênis, ambas provenientes das artérias pudendas internas (ramos das artérias ilíacas internas). Formam uma importante rede vascular cujas artérias de maior diâmetro são as artérias profundas do pênis (Gray *et al.* 1988, Latarjet *et al.* 1993).

A drenagem venosa do pênis é feita através da veia profunda do pênis, que leva a maior parte do sangue dos corpos cavernosos e do corpo esponjoso para o plexo prostático. A pele e a tela subcutânea são drenadas pela veia dorsal superficial do pênis, tributárias da veia pudenda externa, que drena o sangue para a veia safena magna (Gray *et al.* 1988, Latarjet *et al.* 1993).

Os vasos linfáticos da pele e prepúcio drenam a linfa para os linfonodos inguinais superficiais. Os da glândula e corpos eréteis drenam para linfonodos inguinais profundos, femorais, retrofemorais e pré-viscerais (Gray *et al.* 1988, Latarjet *et al.* 1993).

A inervação do pênis é feita por fibras sensitivas, através dos ramos do nervo pudendo, nervo dorsal do pênis e do nervo ilioinguinal. Fibras simpáticas, parassimpáticas e fibras não adrenérgicas e não-colinérgicas,

estão relacionados com o controle da circulação do sangue no pênis (Gray *et al.* 1988, Latarjet *et al.* 1993).

Fibras autônomas que inervam o tecido erétil têm sua origem em gânglios simpáticos lombares. A ereção depende de ramos provenientes do plexo hipogástrico inferior, do qual participam os nervos esplâncnicos pélvicos, que são elementos do plexo parassimpático pélvico (Gray *et al.* 1988, Latarjet *et al.* 1993).

1.1.2 Histologia

O tecido erétil do pênis humano (corpo cavernoso) é composto de fibras elásticas, fibras colágenas, músculo liso, artérias e veias, que são envolvidas pela túnica albugínea formada principalmente de colágeno e tecido elástico. Estas estruturas penianas possuem funções importantes no mecanismo da ereção (Goldstein *et al.* 1982, Lue 2002, Wespes *et al.* 1991).

O interior do corpo cavernoso e esponjoso estão divididos por trabéculas que formam numerosos espaços vasculares, denominados sinusóides. As trabéculas são formadas por fibras do sistema elástico, fibras colágenas e fibras musculares lisas. Estes elementos dão sustentação aos nervos, sinusóides e artérias (Iacono *et al.* 1994).

1.1.2.1 Matriz extracelular

A matriz extracelular é a uma rede estrutural complexa formada por macromoléculas que circundam e sustentam as células dentro do tecido conjuntivo. É formada por diferentes moléculas que são produzidas e exportadas pelas células modulando a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos. A matriz extracelular é dividida em três componentes principais:

- Componentes fibrilares - colágeno e fibras do sistema elástico;
- Componentes não fibrilares – proteoglicanos e glicoproteínas não colagênicas (Gartner *et al.* 2007, Ross *et al.* 2008).

➤ *Elementos fibrosos da matriz extracelular (componentes fibrilares)*

- ***Colágeno***

As fibras colágenas são as proteínas fibrosas mais abundantes no reino animal, representando cerca de 1/3 do total das proteínas encontradas nos tecidos e resistentes a tensão (Van der Rest *et al.* 1991). As fibras colágenas são constituídas por três cadeias protéicas longas organizadas em α -hélice. Uma característica do colágeno é que 30% dos aminoácidos correspondem à glicina. A estrutura primária das cadeias é formada por uma sequência de três aminoácidos: Gly-X-Y (domínios colagênicos), que se repetem por grandes extensões. 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 (Kadler *et al.* 1996).

O tamanho e a forma das fibras colágenas variam dependendo do tecido e do órgão, mesmo dentro da mesma espécie. Seu diâmetro pode variar de 1 a 20 μm e apresentam um curso ondulado, mesmo quando formam fibras densas de tecido conjuntivo como, por exemplo, nos tendões. A forma ondulada dessas fibras aumenta a resistência dessas fibras, resistindo melhor às tensões (Ushiki 2002).

- ***Fibras do 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 a trações mínimas e retomam sua forma inicial após o término das forças deformantes (Junqueira *et al.* 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 são constantemente submetidos a grandes forças de estiramento (Cotta-Pereira *et al.* 1984).

A fibra elástica é uma estrutura complexa formada por elastina, proteína microfibrilar, lisil-oxidase, e proteoglicanos (Mecham 1991).

Sabe-se que, durante o processo de formação de uma fibra elástica, o componente microfibrilar é o primeiro que aparece. Em seguida a elastina é depositada provavelmente devido a uma interação iônica entre a elastina e a

superfície microfibrilar como conseqüência de suas cargas opostas (Rosenbloom *et al.* 1993, Ross *et al.* 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;

2- Fibras elaunínicas: com pouca elastina e grande número de microfibrilas organizadas em feixes;

3- Fibras oxitalânicas: compostas somente por microfibrilas (Gartner *et al.* 2007, Ross *et al.* 1969).

1.1.2.2 Fibras Musculares lisas

A musculatura lisa dos corpos cavernosos do pênis apresenta-se geralmente como feixes ou folhetos de células fusiformes alongadas, com extremidades finas e gradativamente afiladas. As células variam quanto ao comprimento: de 20 μ m nas paredes de pequenos vasos sanguíneos a cerca de 200 μ m. Os núcleos das células musculares lisas estão localizados no centro da célula e, com frequência aparecem nos cortes transversais com a forma de saca rolhas. Essa característica é o resultado da contração celular durante a fixação, muito útil para se distinguir as células musculares lisas dos miofibroblastos nos cortes histológicos de rotina. Na célula não contraída, o núcleo aparece como uma estrutura alongada com extremidades afiladas gradativamente, situada no eixo central da célula. Quando em corte transversal, o núcleo de uma fibra muscular lisa aparece

com um perfil arredondado ou circular, dependendo se a célula estiver contraída ou relaxada (Gartner *et al.* 2007, Ross *et al.* 2008).

A célula muscular lisa é o principal componente de contração e relaxamento do corpo cavernoso. Para se alcançar a tumescência e manter a rigidez peniana, é preciso uma determinada percentagem de células musculares lisas (Wespes *et al.* 1991). O papel do músculo liso no corpo cavernoso é a manutenção da ereção, aumentando a pressão intra-cavernosa durante a ereção a qual não pode ser obtida apenas por mecanismos vasculares (Goldstein *et al.* 1982).

1.2 Fisiologia da ereção

A ereção é uma resposta do pênis a um estímulo sexual. O grau de ereção é proporcional ao grau de estimulação psíquica ou física, e é causada por impulsos parassimpáticos iniciando-se na porção sacral da medula espinhal, continuando pelos nervos pélvicos e chegando até o pênis (Guyton *et al.* 1997). Segundo Jevtich *et al.* (1990), o mecanismo de ereção peniana é um processo fisiológico complexo que é baseado em fatores neurais, vasculares, hormonais e de estruturais.

Sabe-se que a capacidade de ter e manter a ereção depende de uma função neurológica e vascular intacta em presença de fatores hormonais e psicológicos adequados. A ereção é fundamentalmente um fenômeno que depende do sistema nervoso autônomo parassimpático, embora estejam aumentando as provas histoquímicas e neurofarmacológicas do papel exercido pelo sistema nervoso simpático. A ereção peniana é um evento vascular controlado pela integridade das fibras de músculo liso e as trabéculas do corpo cavernoso. A dilatação dos vasos arteriais resulta no

aumento do influxo arterial e provoca relaxamento do músculo liso intracavernoso e distensão dos espaços cavernosos (Sattar *et al.* 1994, Smith 1985).

A liberação de adrenalina mantém contraída a musculatura lisa dos corpos eréteis e faz com que o pênis permaneça no estado flácido.

Segundo Smith (1985), Andersson *et al.* (1995) e Saenz de Tejada *et al.* (1996) são necessários três eventos vasculares para o início e manutenção da ereção. São eles:

1. Aumento do fluxo sanguíneo arterial para os corpos cavernosos.

Após estimulação sexual, um grande fluxo arterial penetra para expandir todo o sistema sinusoidal, até que seja estabelecido um novo equilíbrio que ocorre com uma pressão de aproximadamente 100mmHg, quando apenas quantidades limiares de fluxo entram e saem dos corpos cavernosos para manter a ereção. O processo de ereção ocorre devido a alterações nos espaços cavernosos que se dilatam e se enchem de sangue na ereção e se tornam colapsados e com pouco sangue no estado de flacidez. Essa pequena quantidade de sangue nos corpos cavernosos, no estado de flacidez, visa somente atender as suas necessidades metabólicas.

2. Relaxamento do músculo liso cavernoso.

As estruturas musculares lisas presentes no corpo cavernoso são de grande importância no mecanismo da ereção. É indispensável o relaxamento dessa musculatura, tanto cavernosa quanto vascular, para que ocorra um aumento do fluxo arterial, e, conseqüentemente, o preenchimento dos espaços sinusoidais por sangue.

3. Diminuição do retorno venoso, mantendo o sangue no interior do corpo cavernoso.

Quando os espaços sinusoidais já estão expandidos, a pressão intracavernosa começa a aumentar, havendo uma compressão na região sob a túnica albugínea, através da qual passam as veias emissárias resultando

em um grande aumento da resistência ao fluxo de saída. Isto faz com que pare quase que totalmente a saída de sangue pelas veias, acumulando sangue dentro dos corpos cavernosos levando a rigidez do pênis e à ereção. Estes fenômenos são conhecidos como mecanismo de veno-oclusão normal dos corpos cavernosos (Andersson *et al.* 1995, Lue 2002, Saenz de Tejada *et al.* 1996).

1.3 Priapismo

Descrito pela primeira vez por Tripe (1845) o priapismo foi definido como uma doença que se caracteriza por uma ereção prolongada, mantida por mais de 4 horas de duração, frequentemente dolorosa, desencadeada ou não pelo estímulo sexual (Adeyoju *et al.* 2002, Maan *et al.* 2003, Burnett *et al.* 2007, Chow *et al.* 2008, Yuan *et al.* 2008). O priapismo afeta os corpos cavernosos e é normalmente bilateral não afeta o corpo esponjoso e a glândula. Essa característica permite diagnosticar a doença. O fator responsável pela persistência da ereção é a congestão sanguínea nos sinusóides do corpo cavernoso (Adeyoju *et al.* 2002).

De acordo com o fluxo sanguíneo pode ser classificado em: priapismo isquêmico, de baixo fluxo ou venoclusivo; priapismo não-isquêmico, de alto fluxo ou arterial.

- Priapismo isquêmico, de baixo fluxo ou venoclusivo.

O priapismo isquêmico está associado à diminuição do retorno venoso com estase vascular o que determina a hipóxia tecidual. Neste tipo de priapismo a drenagem venosa demora a ser feita. Geralmente é doloroso devido a isquemia. O priapismo isquêmico está associado com um alto risco de fibrose dos corpos cavernosos e impotência (Minardi *et al.* 2004).

- Priapismo não isquêmico, de alto fluxo ou arterial.

Priapismo não isquêmico pode ser definido como uma doença de afluência arterial aumentada nos corpos cavernosos (Kuefer *et al.* 2005). É geralmente indolor, ocorrendo aumento do fluxo arterial e o retorno venoso normal, elevando a pressão parcial de O₂. É causado na maioria das vezes por trauma perineal ou peniano. Pode ser idiopático com algumas exceções (Lue 2002).

O tipo isquêmico é o mais comum e responsável por 80% a 90% dos casos. É uma emergência urológica, que pode evoluir para o quadro de disfunção erétil, mesmo após um tratamento efetivo (Minardi *et al.* 2004, Pryor *et al.* 2004, Van der Horst *et al.* 2003). Relaciona-se à congestão sanguínea intra-cavernosa, associada a baixos níveis de O₂ e altos níveis de CO₂, o que leva a um impacto significativo na oxigenação tecidual (Pryor *et al.* 2004, Van der Horst *et al.* 2003). Por outro lado, o priapismo não isquêmico está associado ao surgimento de uma fístula artério-venosa (traumática ou iatrogênica) associada a níveis normais de O₂, não levando a um impacto mínimo na oxigenação tecidual (Lue *et al.* 1986).

De acordo com a classificação etiológica do priapismo ele pode ser primário (idiopático) ou secundário. O priapismo secundário está associado a uma causa conhecida, como por exemplo, abuso de álcool ou uso excessivo de drogas, trauma perineal e doenças hematológicas (Lue 2002, Mulhall *et al.* 1996).

A maior incidência dos casos de priapismo isquêmico é encontrada nos indivíduos com idade entre 16 a 45 anos. Na maioria das vezes, trata-se de priapismo idiopático. Em indivíduos mais jovens com doenças hematológicas, como a anemia falciforme, o primeiro episódio de priapismo pode ocorrer entre 15 e 20 anos sendo que em 75% dos casos ocorre até os 20 anos (Adeyolu *et al.* 2002). Outros casos mais frequentes

são devidos à drogas injetáveis utilizadas para o diagnóstico e tratamento de disfunção erétil e no uso indiscriminado de drogas ilícitas (Lue 2002).

Numa revisão de literatura envolvendo 230 casos, foram encontradas as seguintes causas mais frequentes: idiopáticas (35%); associação com abuso de álcool ou drogas (21%); trauma perineal (12%); anemia falciforme (11%) e doença inflamatória do trato genital (8%). De um modo geral, o priapismo idiopático representa quase a metade dos casos, os quais, em sua grande maioria, têm relatos de episódios prévios. As injeções intracavernosas para o tratamento da disfunção erétil não estão incluídas nessas casuísticas, uma vez que tornaram o priapismo muito mais freqüente.

Os riscos de ereções prolongadas (entre quatro e seis horas) com a prostaglandina são de 0,4% a 1,7%, e com a papaverina podem ser de até 15%, sendo mais prevalentes entre os pacientes neurogênicos ou psicogênicos (Lue 2002).

O priapismo isquêmico tem ocorrido com freqüência crescente em pessoas com anemia falciforme e em segundo lugar estão os casos sem causas conhecidas (Adeyoju *et al.* 2002).

Segundo Adeyoju *et al.* 2002 a forma mais comum de priapismo na anemia falciforme é o tipo isquêmico.

Estimativas da Organização Mundial de Saúde, mostraram que a cada ano nascem no Brasil cerca de 2500 crianças portadoras de Doença Falciforme. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado representam papel fundamental na redução da morbidade e mortalidade destas crianças. Entre os sinais e sintomas mais freqüentes da doença falciforme está o priapismo. O priapismo afeta cerca de 42% dos adultos portadores de anemia falciforme (Emond *et al.* 1980).

Na anemia falciforme as células rígidas obstruem os pequenos capilares e vênulas, causando isquemia tecidual, dor aguda e a lesão

gradual de órgãos terminais. Esse componente isquêmico geralmente domina a evolução clínica (Braunwald *et al.* 2002).

Uma das condições do priapismo persistente é determinada pela congestão prolongada de sangue nos sinusóides do corpo cavernoso, podendo evoluir para uma disfunção erétil (Van der Horst *et al.* 2003).

Sharpsteen *et al.* (1993) analisando 461 pacientes com anemia falciforme constatou que 87% dos pacientes apresentaram priapismo e no caso de priapismo prolongado ou recidivado, 56% dos casos evoluíram para disfunção erétil (Sharpsteen *et al.* 1993).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Os trabalhos sobre priapismo assinalam que a disfunção erétil é uma das principais complicações apresentadas pelos pacientes com priapismo isquêmico (Emond *et al.* 1980, Sharpsteen *et al.* 1993, Burnett *et al.* 2007, Chow *et al.* 2008, Yuan *et al.* 2008, Hekal *et al.* 2008,). A análise da literatura mostrou que os três componentes fundamentais dos corpos cavernosos (colágeno, fibras do sistema elástico e músculo liso) formam o substrato morfológico causador da disfunção erétil grave (Costa *et al.* 2006). No priapismo isquêmico, os estudos mostraram, apenas de forma qualitativa, alterações na musculatura lisa e no tecido conjuntivo (Minardi *et al.* 2004, Muneer *et al.* 2005, Spycher *et al.* 1986). Portanto uma análise quantitativa dos três componentes se faz necessária na tentativa de, não somente caracterizar de forma precisa os componentes morfológicos que poderiam estar envolvidos no priapismo isquêmico, como também encontrar uma resposta sobre a disfunção erétil que frequentemente acompanha os pacientes com priapismo isquêmico.

O objetivo do presente trabalho é avaliar através de métodos quantitativos e qualitativos as possíveis alterações no músculo liso, fibras do sistema elástico e colágeno nos corpos cavernosos do pênis de pacientes com priapismo isquêmico e comparar estes resultados com o grupo controle.

3 MATERIAIS E MÉTODOS*

Foram estudados fragmentos de corpo cavernoso provenientes de 7 pacientes com quadro de priapismo isquêmico, com idade entre 26 e 55 anos (média de 38 anos), submetidos a tratamento cirúrgico para a confecção de uma fistula glandar-cavernosa pela técnica de Al-Ghorab (Ercole *et al.* 1981).

A técnica de Al-Ghorab consiste na realização de uma incisão de 2 cm transversal e paralela em 1 cm à borda da glândula com estabelecimento direto da comunicação entre o corpo esponjoso e os corpos cavernosos. O fechamento subsequente é apenas da superfície glandar em sutura contínua com mononáilon fino (figura 3) (Ercole *et al.* 1981).

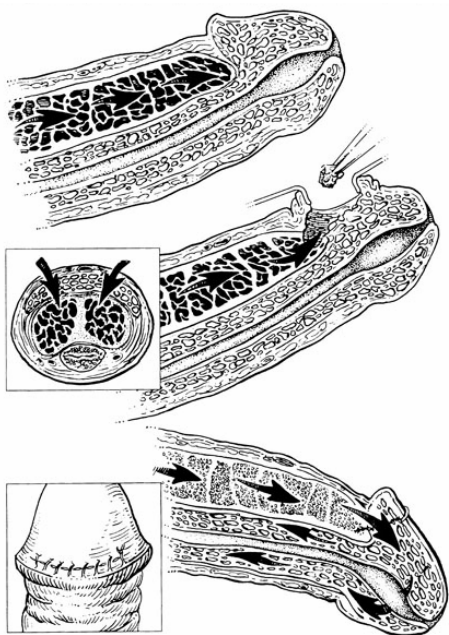


Figura 7 – Técnica de Al-Ghorab. (Lewis et al. 2002. p. 1695)

*Este trabalho foi submetido e aprovado no comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Nos pacientes analisados o tempo de evolução do priapismo foi de 48 a 72 horas (média de 56 horas) sendo o primeiro episódio de priapismo diagnosticado em todos os pacientes. Técnicas menos invasivas como punção / irrigação cavernosas ou injeção de agentes vasoconstrictores falharam antes da indicação cirúrgica. Os pacientes analisados não apresentavam doenças como diabetes e hipertensão, que poderiam contribuir para alterar a estrutura do pênis. Dois casos (28,58%) foram de origem idiopática e cinco casos (72,42%) estavam relacionados à anemia falciforme.

O grupo controle foi composto por fragmentos do corpo cavernoso, obtidos de 7 cadáveres frescos, até 6 horas após a morte com idade entre 36 e 57 anos (média de 42 anos), onde a causa mortis não estava relacionada ao sistema urogenital.

O material foi processado para inclusão em parafina. Os cortes foram feitos com 5 μ m de espessura e submetidos a diferentes técnicas de coloração. Inicialmente os cortes foram corados pela hematoxilina / eosina (HE) verificando-se a integridade do tecido. Posteriormente foram submetidos a outras técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas.

- Histoquímica

Para a caracterização, quantificação e a análise qualitativa das fibras colágenas, foram realizados cortes corados pelo Tricrômico de Masson e pelo Vermelho de Picrosirius.

A caracterização e quantificação das fibras do sistema elástico, foram realizadas em cortes corados pela Resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação pela oxona.

- Imunohistoquímica

As fibras musculares lisas foram evidenciadas e quantificadas pela imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti α Actina de músculo liso, Zymed Laboratories. Para o anticorpo primário foi utilizado um controle

negativo e controle positivo, usando fragmentos de tecido que apresentam os antígenos pesquisados. A revelação foi feita com solução de 3,3, diamino-benzidina tetrahydroclorido (DAB) a 0,1% em H₂O₂, lavados em água destilada, desidratado em uma serie crescente de etanol diafanizados em xilol e montados com Ethelan.

Foram obtidos 10 cortes de cada uma das amostras e contados 10 campos por corte totalizando 100 campos por indivíduo para cada uma das técnicas utilizadas.

Todos os elementos estudados foram quantificados através de métodos estereológicos que determinam parâmetros tridimensionais a partir de cortes bidimensionais (Mandarim-de-Lacerda 2003).

Os resultados foram obtidos pelo método de contagem de pontos utilizando-se o sistema teste M-42 sobre um monitor de um computador. De acordo com os princípios estereológicos, a distribuição por área é proporcional à distribuição por volume, quando a região considerada é homogênea (Mandarim-de-Lacerda 2003, Costa *et al.* 2008).

O teste t de Student não pareado foi utilizado para determinar se há diferença significativa entre as médias dos dois grupos analisados.

4 RESULTADOS

A tabela 1 e as figuras 4,5 e 6 apresentam os resultados quantitativos dos diferentes elementos analisados.

Os resultados mostraram diminuição significativa das fibras musculares lisas (Figuras 7). As fibras do sistema elástico assim como as fibras colágenas mostraram aumento significativo quando comparados ao grupo controle (Figuras 8). A análise qualitativa feita através do método de coloração pelo Vermelho de Picrosirius e observada sob luz polarizada, mostrou a existência de uma diversidade de tipos de colágeno nas trabéculas do tecido cavernoso, caracterizada pela presença de colorações variando do vermelho e alaranjado ao verde (Figuras 9).

Tabela 1 - Análise estereológica do colágeno, músculo liso e fibras do sistema elástico do corpo cavernoso de pênis de pacientes com priapismo isquêmico e o grupo controle.

	Músculo liso%		Fibras do Sist. elástico %		Colágeno %	
	Controle	Priapismo	Controle	Priapismo	Controle	Priapismo
Média	43.37	26.48	28.10	36.10	34.76	39.64
DP	4.96	5.00	2.85	3.06	4.64	2.91
Valor de p	< 0.0001		0.0012		0.0019	

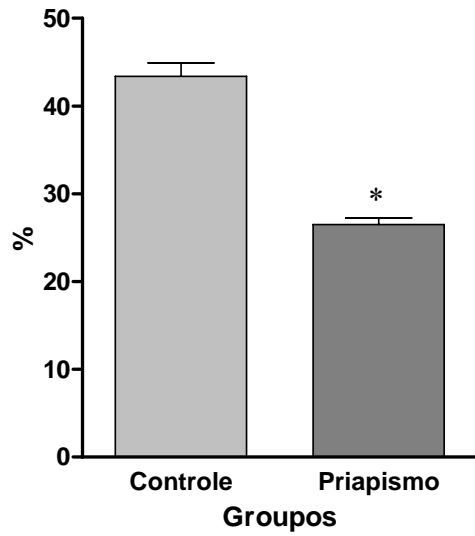


Figura 4 – Análise estereológica das fibras musculares lisas no corpo cavernoso do pênis. $P < 0.0001$

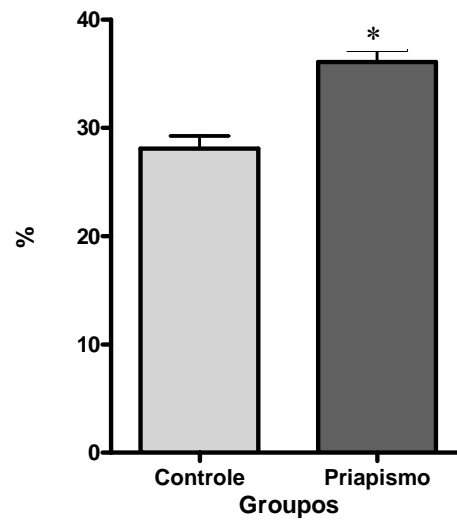


Figura 5 – Análise estereológica das fibras do sistema elástico no corpo cavernoso do pênis. $P = 0.0012$

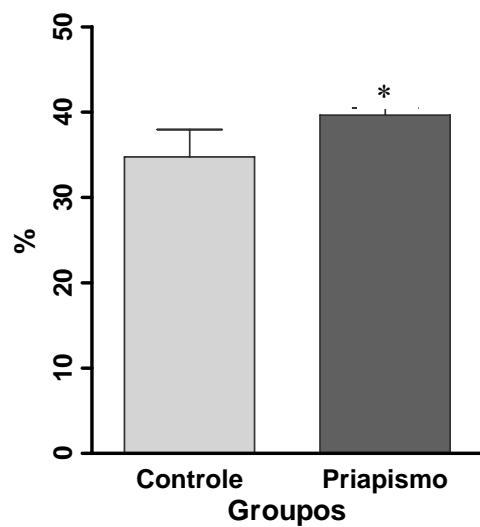
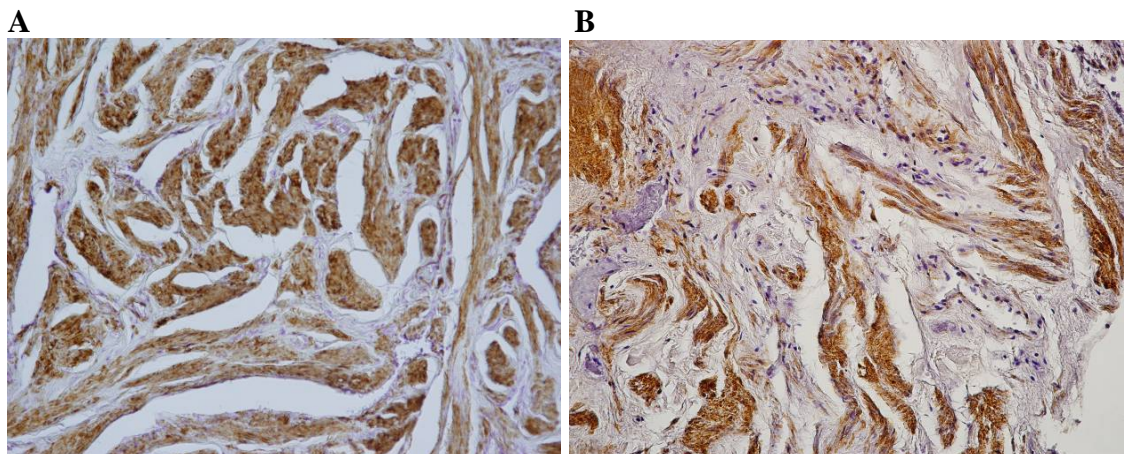
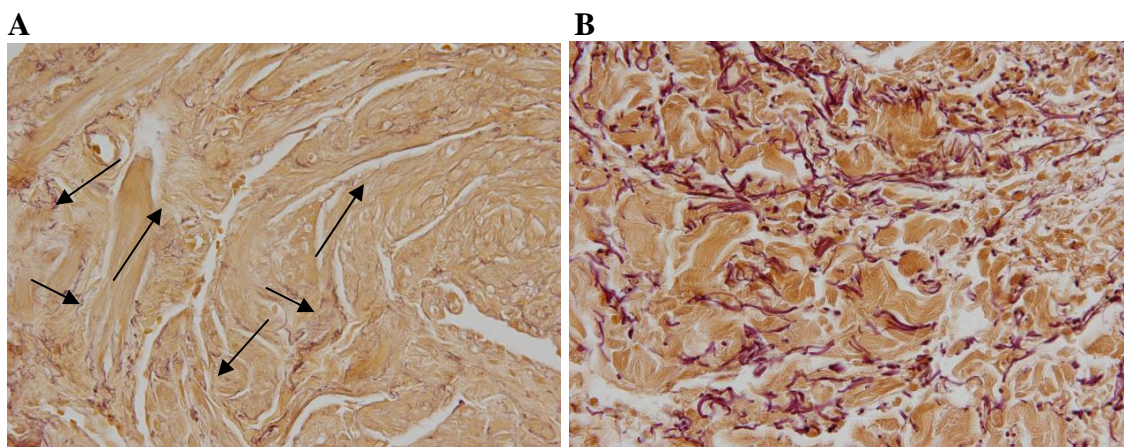


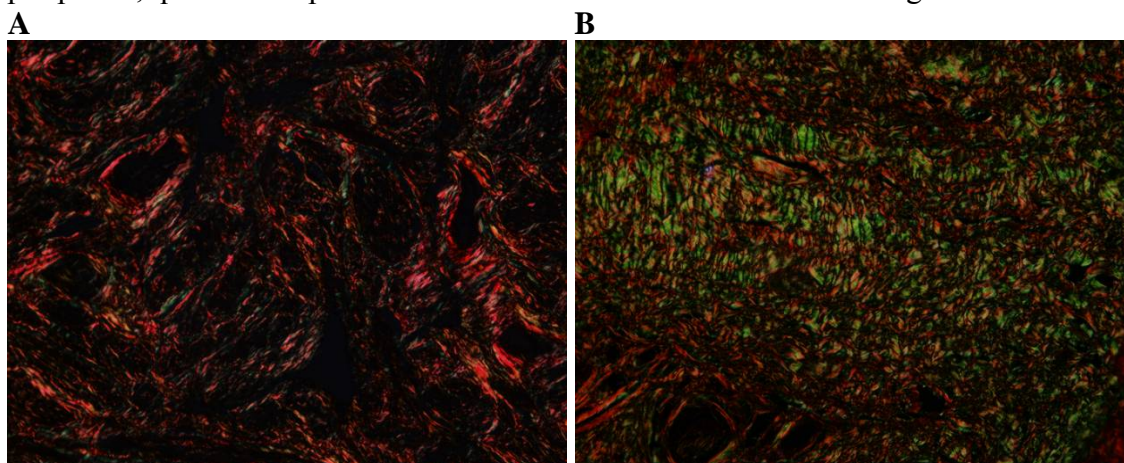
Figura 6 – Análise estereológica das fibras colágenas no corpo cavernoso do pênis. $P = 0.0019$



Figuras 7 - Fibras musculares lisas no corpo cavernoso. A) Grupo controle, B) Grupo Priapismo. Há diminuição das fibras musculares lisas em pacientes com priapismo, pode-se observar uma diminuição das fibras musculares lisas no grupo priapismo, quando comparados ao grupo controle. Imunohistoquímica com anti- α -actina de músculo liso. 200X



Figuras 8 - Fibras do sistema elástico no corpo cavernoso. A) Grupo controle, B) Grupo priapismo. Existe aumento de fibras do sistema elástico (setas) em pacientes com priapismo, quando comparados ao controle. Resorcina-fucsina de Weigert. 400X



Figuras 9 - Fibras colágenas no corpo cavernoso. A) Grupo controle, B) Grupo priapismo. Há predomínio da cor vermelha, no grupo controle, enquanto que no grupo priapismo há predomínio da cor verde. Vermelho de Picro Sirius observado sob luz polarizada. 200X.

5 DISCUSSÃO

No processo de priapismo observamos uma ereção mantida com ausência de detumescência peniana o que corresponde a um desarranjo da fisiologia eretora (Muneer *et al.* 2005, Spycher *et al.* 1986).

É possível supor que a disfunção erétil, frequentemente encontrada em pacientes com priapismo persistente por mais de 48 horas, possa encontrar um substrato morfológico em modificações conspícuas nos diferentes elementos da matriz extracelular dos corpos cavernosos do pênis. Uma análise quantitativa desses elementos pode trazer uma contribuição para se entender melhor os efeitos do priapismo sobre os corpos cavernosos do pênis e disfunção erétil.

O mecanismo necessário para se alcançar o estado flácido, e sua permanência, envolve a contração da musculatura lisa. Por isso ela é a estrutura de maior importância no processo de ereção e detumescência (Van der Horst *et al.* 2003).

Muneer *et al.* (2005), assinalam que durante o priapismo, o tecido cavernoso sofre hipóxia, acidose e glicopenia. Segue-se uma infiltração de células inflamatórias e proliferação de fibroblastos, resultando em necrose do músculo liso dos corpos cavernosos e o aparecimento de fibrose em diferentes graus (Hekal *et al.* 2008, Muneer *et al.* 2005, Ralph *et al.* 2008). Esta substituição de tecido erétil normal por um tecido fibrótico deve estar diretamente envolvida na gênese do distúrbio erétil tardio que frequentemente acompanha os pacientes com priapismo (Muneer *et al.* 2005, Ralph *et al.* 2008). Segundo Spycher *et al.* (1986) e Muneer *et al.* (2005) é possível observar, após 24h de evolução do priapismo isquêmico, uma necrose focal da musculatura lisa e a sua transformação em células fibroblasto-like (Hekal *et al.* 2008, Ralph *et al.* 2008). Essas observações

poderiam justificar a redução marcante do componente muscular (16,89%) quando analisado num tempo superior a 48 horas de evolução como foi o caso no presente trabalho.

As fibras do sistema elástico foram também significativamente afetadas apresentando um aumento de 8%. É possível supor que a isquemia que gera a transformação de células musculares lisas em células fibroblasto-like também seja a causa do aumento de fibras do sistema elástico no corpo cavernoso, o que poderia contribuir para promover a detumescência peniana como ocorre na túnica albugínea, onde as fibras do sistema elástico são co-responsáveis por promover uma rápida e adequada recuperação do estado de detumescência (Hsu *et al.* 2006). O comportamento das fibras do sistema elástico parece ser *sui generis* manifestando-se de forma diferente dependendo do estímulo recebido. Costa *et al.* (2006), analisando o sistema elástico num estudo sobre disfunção erétil grave, no qual o priapismo não foi incluído na amostra, mostrou que estas fibras diminuem significativamente. Isto nos leva a supor que o mecanismo de reação do tecido erétil, com relação às fibras do sistema elástico, é peculiar no priapismo isquêmico.

O aumento do colágeno foi estatisticamente significativo nos pacientes analisados, porém proporcionalmente menor, quando comparado aos outros elementos estudados: sistema elástico e músculo liso. O colágeno apresentou um aumento de 4,8%, caracterizando o aparecimento de fibrose. Esta transformação parece ocorrer em um tempo relativamente curto. Em nosso grupo de pacientes o tempo de evolução variou de 48 a 72 horas sendo este o primeiro episódio de priapismo. Costa *et al.* (2006) e Luangkhot *et al.* (1992), assinalaram o fato de não ocorrer um aumento significativo no conteúdo de colágeno no tecido cavernoso de pacientes com disfunção erétil. No entanto, estes estudos não enfocaram o priapismo isquêmico como fator etiológico da disfunção sexual erétil. A isquemia

tecidual é conhecida como fator estimulador da produção de colágeno. A transformação de células da musculatura lisa em células fibroblasto-like como foi descrito anteriormente, também poderia ter um papel relevante neste processo justificando o aumento do colágeno nos pacientes analisados (Spycher *et al.* 1986).

A observação qualitativa, através da microscopia de polarização, dos cortes corados pelo Vermelho de Picrosirius, mostra diferentes cores sobre as trabéculas do corpo cavernoso. A predominância da cor verde observada nos cortes dos pacientes com priapismo nos permite supor, que existe maior quantidade de um tipo de colágeno, possivelmente o colágeno tipo III. O grupo controle se caracterizou por uma cor que varia do vermelho a vermelho alaranjado e que seria possivelmente o colágeno tipo I. Parece, portanto, ocorrer um turnover importante, com um processo ativo de formação de colágeno no grupo de pacientes com priapismo.

Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que o priapismo isquêmico está associado a significativas alterações nos componentes dos corpos cavernosos, principalmente pela diminuição da musculatura lisa. Este processo parece iniciar-se precocemente, tendo sido observado no presente trabalho após as primeiras 48 horas de evolução.

Sabemos que o tempo de evolução do priapismo isquêmico é o principal fator de risco para o desenvolvimento de disfunção erétil (El-Bahnasawy *et al.* 2002, Minardi *et al.* 2004). Portanto a análise e os resultados aqui apresentados corroboram morfológicamente para que o tratamento do priapismo isquêmico deva ser baseado em uma abordagem agressiva e precoce, visando a detumescência peniana e o restabelecimento de uma adequada oxigenação tecidual.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o priapismo isquêmico está associado à diminuição da musculatura lisa, aumento das fibras do sistema elástico assim como alterações no colágeno dos corpos cavernosos de pacientes com priapismo isquêmico. Estas observações poderiam explicar a disfunção erétil que ocorre frequentemente em pacientes com este tipo de priapismo.

7 REFERÊNCIAS

- Adeyolu AB, Olujohungbe AB, Morris J, Yardumian A, Bareford D, Akenova A, Cinkotai K, O'Reilly PH. Priapism in sickle-cell disease; incidence, risk factors and complications - an international multicentre study. *BJU Int.* 2002; 90: 898-902.
- Andersson KE, Wagner G. Physiology of penile erection. *Physiol Rev.* 1995; 75: 191-236.
- Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. *Harrison medicina interna.* 15.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil. 2002; vol. 1, p. 711.
- Brooks JD. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ. *Campbell's Urology.* 8.ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Science. 2002. vol. 1, pp. 72-75
- Burnett AL, Bivalacqua TJ. Priapism: current principles and practice. *Urol Clin North Am* 2007; 34: 631-642.
- Chow K, Payne S. The pharmacological management of intermittent priapismic states. *BJU Int.* 2008; 102: 1515-1521.
- Costa WS, Carrerete FB, Horta WG, Sampaio FJ. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU Int.* 2006; 97: 567-9.

- Costa WS, Rebello SB, Cardoso LE, Cavalcanti AG, Sampaio FJ. Stereological and biochemical analysis of muscular and connective tissue components in the penile corpus cavernosum adjacent to the fibrous plaque of Peyronie's disease. *BJU Int.* 2008; 103: 212 – 216.
- Cotta-Pereira G, Del-Caro LM, Montes GS. Distribution of elastic system fibers in hyaline and fibrous cartilages of the rat. *Acta Anat (Basel).* 1984; 119: 80-5.
- El-Bahnasawy MS, Dawood A, Farouk A. Low-flow priapism: risk factors for erectile dysfunction. *BJU Int.* 2002; 89: 285-90.
- Emond AM, Holman R, Hayes RJ, Serjeant GR. Priapism and impotence in homozygous sickle cell disease. *Arch Intern Med.* 1980; 140: 1434-7.
- Ercole CJ, Pontes JE, Pierce JM, Jr. Changing surgical concepts in the treatment of priapism. *J Urol.* 1981; 125: 210-1.
- Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histologia* 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007. p. 131-154.
- Goldstein AM, Meehan JP, Zakhary R, Buckley PA, Rogers FA. New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. *Urology.* 1982; 20: 259-66.
- Gray H, Gross GF. *Anatomia.* 29 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1988. p. 1072-178.

- Guyton, Hall. Tratado de Fisiologia Médica. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997. p. 862.
- Hekal IA, Meuleman EJ. Idiopathic low-flow priapism in prepuberty: a case report and a review of literature. *Adv Urol*. 2008; 2008: 549861.
- Hsu L, Diwan B, Ward JM, Noguchi CT. Pathology of "Berkeley" sickle-cell mice includes gallstones and priapism. *Blood*. 2006; 107: 3414-5.
- Iacono F, Barra S, de Rosa G, Boscaino A, Lotti T. Microstructural disorders of tunica albuginea in patients affected by impotence. *Eur Urol*. 1994; 26: 233-9.
- Jevtich MJ, Khawand NY, Vidic B. Clinical significance of ultrastructural findings in the corpora cavernosa of normal and impotent men. *J Urol*. 1990; 143: 289-93.
- Junqueira L, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. pp. 124.
- Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *Biochem J*. 1996; 316 (Pt 1):1-11.
- Kuefer R, Bartsch G, Jr., Herkommer K, Kramer SC, Kleinschmidt K, Volkmer BG. Changing diagnostic and therapeutic concepts in high-flow priapism. *Int J Impot Res*. 2005; 17: 109-13.
- Latarjet M, Ruiz-Liard A. *Anatomia Humana*. 2. ed. São Paulo: Panamericana. 1993. vol. 2, p. 1703-1709

- Lewis RW, Jordan G. Surgery for erectile dysfunction. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein.AJ. Campell's Urology. 8. ed. Philadelphia: WB Saunders. 2002a; vol. 2, pp. 1695-6.
- 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. 1992; 148 (2 Pt 1): 467-71.
- Lue TF, Hellstrom WJ, McAninch JW, Tanagho EA. Priapism: a refined approach to diagnosis and treatment. J Urol. 1986; 136: 104-8.
- Lue TF. Physiology of penis erection and pathophysiology of impotence. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein.AJ. Campell's Urology. 8. ed. Philadelphia: WB Saunders. 2002a; vol. 2, pp. 1591-1613.
- Maan Z, Arya M, Patel HR. Priapism - a review of the medical management. Expert Opin Pharmacother. 2003; 4: 2271-7.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. An Acad Bras Cienc. 2003; 75: 469-86.
- Mecham RP. Receptors for laminin on mammalian cells. FASEB J. 1991; 5: 2538-46.
- Minardi D, Milanese G, Galosi AB, Donatelli G, Muzzonigro G. Persistent priapism and histological modifications of the erectile tissue. Two case reports. Arch Ital Urol Androl. 2004; 76: 97-9.

- Mulhall JP, Honig SC. Priapism: etiology and management. *Acad Emerg Med.* 1996; 3: 810-6.
- Muneer A, Cellek S, Dogan A, Kell PD, Ralph DJ, Minhas S. Investigation of cavernosal smooth muscle dysfunction in low flow priapism using an in vitro model. *Int J Impot Res.* 2005; 17: 10-8.
- Pryor J, Akkus E, Alter G, Jordan G, Lebret T, Levine L, et al. Priapism. *J Sex Med.* 2004; 1: 116-20.
- Ralph DJ, Garaffa G, Muneer A, Freeman A, Rees R, Christopher AN, et al. The Immediate Insertion of a Penile Prosthesis for Acute Ischaemic Priapism. *Eur Urol.* 2008; 1.
- Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J.* 1993; 7: 1208-18.
- Ross MH, Pawlina W. *Histologia: texto e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular.* 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008; pp. 147-181.
- Ross R, Bornstein P. The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J Cell Biol.* 1969; 40: 366-81.
- Saenz de Tejada YGI. [Physiology of penile erection]. *Arch Esp Urol.* 1996; 49: 202-5.

- Sattar AA, Wespes E, Schulman CC. Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. *Eur Urol.* 1994; 25: 142-4.
- Sharpsteen JR, Jr., Powars D, Johnson C, Rogers ZR, Williams WD, Posch RJ. Multisystem damage associated with tricorporal priapism in sickle cell disease. *Am J Med.* 1993; 94: 289-95.
- Smith RD. *Urologia geral.* 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1985.
- Spycher MA, Hauri D. The ultrastructure of the erectile tissue in priapism. *J Urol.* 1986; 135: 142-7.
- Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol.* 2002; 65: 109-26.
- Van der Horst C, Stuebinger H, Seif C, Melchior D, Martinez-Portillo FJ, Juenemann KP. Priapism - etiology, pathophysiology and management. *Int Braz J Urol.* 2003; 29: 391-400.
- Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991; 5: 2814-23.
- 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.* 1991; 146: 1015-7.

- Yuan J, Desouza R, Westney OL, Wang R. Insights of priapism mechanism and rationale treatment for recurrent priapism. *Asian J Androl.* 2008; 10: 88-101.

ANEXO A – Termo de consentimento informado

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Pós Graduação em Fisiocirurgia e Ciências Cirúrgica
Hospital Municipal Souza Aguiar - Serviço de Urologia

Termo de Consentimento Informado

TÍTULO DO PROJETO: ESTUDO ESTRUTURAL DO CORPO CAVERNOSO DO PÊNIS DE INDIVÍDUOS COM PRIAPISMO DO TIPO VENOCCLUSIVO.

O Sr. vai ser submetido a uma cirurgia para o tratamento de priapismo. Normalmente, durante esta cirurgia, retira-se um fragmento que depois é enviado para exame histopatológico, procedimento de rotina para o serviço de Anatomia Patológica, para inclusão em estudos de rotina e arquivamento.

Gostaríamos de solicitar ao senhor que tenha a gentileza de nos autorizar a estudar um fragmento do material doente que será extraído durante a cirurgia a qual o Sr. será submetido.

Esta extração será feita durante a cirurgia e não implicará em aumento do tempo de cirurgia nem alterará os resultados operatórios.

Será respeitado o segredo médico e sua identidade não será revelada.

O grupo de médicos e professores que estão fazendo parte deste trabalho estarão à sua disposição no Serviço de Urologia deste hospital e na Pós Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro- Departamento de Anatomia do Hospital Universitário Pedro Ernesto, à Av 28 de Setembro, número 77, fundos. Telefone 2587-6499. Sendo o pesquisador responsável o Dr Bruno Félix Patrício estando sempre à disposição para maiores esclarecimentos.(deixe aqui o seu cel- apenas para constar)

Os dados e resultados finais serão utilizados somente para esta pesquisa.


Eu, _____ (nome completo), portador da identidade _____, declaro estar ciente do que foi exposto acima e autorizo a utilização, para fins científicos, do fragmento do pênis que será extraída durante a cirurgia a qual serei submetido.

Rio de Janeiro, de _____ de 2008.

 Paciente

ANEXO B

Endereço http://mts-ijir.nature.com/cgi-bin/main.plex?form_type=status_details&ms_id=2604&ms_rev_no=0&ms_id_key=urIeu3Bp1RJHU5fyl4yBdw&sj_id=


 **manuscripttrackingssystem** International Journal of **Impotence Research**


[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	IJIR-03-2009-030
Current Revision #	0
Submission Date	8th Mar 09
Current Stage	Manuscript Submitted
Title	Structural Analysis of the Corpora Cavernosa in Patients with Ischemic Priapism
Short title	Corpora Cavernosa in Ischemic Priapism
Manuscript Type	Original Article
Category	Basic Science Male
Corresponding Author	Prof. Francisco Sampaio (State University of Rio de Janeiro)
Contributing Authors	Prof. Waldemar Costa , Mr. Bruno Patricio , Dr. Andre Cavalcanti , Mr. Jorge Medeiros Jr.
Associate Editor	Not Assigned
Keywords	Priapism of penis and clitoris, Anatomy (gross and microscopic), Risk factors

Stage	Start Date
Manuscript Submitted	9th Mar 09
Author Approved Converted Files	9th Mar 09
Waiting for Author Approval of Converted Files	9th Mar 09
Submission	9th Mar 09
Preliminary Manuscript Data Submitted	8th Mar 09



 Iniciar | Priapism_Text - Micro... | 0-ARTIGO-PRIAPISMO | 3 Internet Explorer | Adobe Acrobat - [260...

ANEXO III



Journal of Radiation Research

THE JAPAN RADIATION RESEARCH SOCIETY

Contributor Menu (Dr. Luiz E.M. Cardoso /
Temporary Receipt Number: fyv4099493)

Message to Luiz E.M. Cardoso from
the Editorial Office

Your manuscript was submitted
successfully. Thank you for your
contribution.

[History](#)[Request Withdrawal](#)[Change Password](#)[Edit Profile](#)

**ANEXO D - Structural Analysis of the Corpora Cavernosa in Patients
with Ischemic Priapism**

Running title: Corpora Cavernosa in Ischemic Priapism

**Waldemar S. Costa, Bruno Felix Patricio, Andre G. Cavalcanti, Jorge
Medeiros Jr., Francisco J. B. Sampaio**

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

Conflict of Interest: None

Abstract

The purpose of the present study was to evaluate through quantitative and qualitative methods, the changes in the corpora cavernosa of patients with ischemic priapism. We obtained samples of corpora cavernosa from 7 patients with ischemic priapism, aged between 28 and 44 years (mean = 38), who underwent a cavernosal-glandular shunt. The control tissues were fragments of corpora cavernosa obtained from autopsies of 7 age-matched men who died of causes not related to the urogenital tract. Histochemical and immunohistochemical techniques were used to assess and quantify the extra-cellular matrix and smooth muscle fibers. The volumetric density of smooth muscle, elastic fibers and collagen were determined in corpora cavernosa. The stereological analysis showed the following values of volumetric density in the structures studied. Collagen: controls = 34.76 ± 4.64 , priapism = 39.64 ± 2.91 ($p = 0.0019$); elastic system fibers: controls 28.10 ± 2.85 , priapism 36.10 ± 3.06 ($p = 0.0012$), smooth muscle fibers: controls = 43.37 ± 4.96 , priapism = 26.48 ± 5.00 ($p < 0.0001$). Our results demonstrated a significant increase in the fibrous elements of the connective tissue and a significant decrease of smooth muscle fibers in the corpora cavernosa of patients with ischemic priapism, when compared to controls. As conclusion, this study showed that ischemic priapism is associated with early significant changes in the components of the extra cellular matrix and smooth muscle fibers of corpora cavernosa. This could explain the frequent occurrence of erectile dysfunction found in patients with ischemic priapism.

Keywords: penis; priapism; erectile dysfunction; smooth muscle; extracellular matrix; stereology/quantification

Introduction

Priapism is defined as a pathological condition of prolonged and persistent painful erection of the penis not associated with sexual stimulation and desire (1-3). Persistent erection is caused by blood congestion in the corpora cavernosa sinusoids, which usually are bilaterally involved, with no involvement of the corpus spongiosum (3). Priapism is a urologic emergency and may evolve towards erectile dysfunction, even after effective treatment (1-7).

Priapism is classified as ischemic, low-flow or veno-occlusive and as high flow, non-ischemic or arterial. The first type is the most common accounting for 80% to 90% of cases. Ischemic priapism is related to intracavernous congestion by high-viscosity blood, due to low levels of O₂ and high levels of CO₂, which leads to a significant impact on tissue oxygenation (4,6). In contrast, high-flow priapism is usually associated with arteriovenous fistula (traumatic or iatrogenic) and with normal levels of O₂, and, therefore, does not lead to an important effect on tissue oxygenation (8).

Ischemic priapism is often idiopathic, being the secondary causes often associated with different etiologies. In a study involving a review of 230 cases of priapism, 35% corresponded to idiopathic cases distributed as follows; 21% associated with alcohol or drug abuse, 12% with perineal trauma, 11% with sickle cell anemia and 8% with inflammatory disease of the genital tract (9). The use of intracavernous vasoactive drugs is also linked to the risk of prolonged erections. It is estimated that the risk is 0.4% to 1.7% for the use of prostaglandins and may reach up to 15% with the use of papaverine (10). In prolonged and recurrent cases, the rate of erectile dysfunction can be as high as 56% (11).

The majority of cases of ischemic priapism occur in patients aged between 16 and 45 years old, being idiopathic in most cases. In young patients, with hematologic diseases as sickle cell anemia, the first episode of priapism can occur between 15 and 20 years old, and in 75% of cases, the first episode occurs before 20 years old (12). Priapism is among the most frequent manifestation of sickle cell disease, affecting between 42% and 87% of the patients (11-13). Several studies have shown that erectile dysfunction is the most serious complication of ischemic (low-flow) priapism (1-4,14,15). A literature review shows that most studies regarding the alterations of low-flow priapism focused only on the smooth muscle as the pathological substrate for erectile dysfunction and did not in fact, examine other important elements that could also contribute to erectile dysfunction.

In most cases, erectile dysfunction, which occurs frequently in patients with priapism lasting for more than 48 hours, can have a morphological substrate with conspicuous changes in the different elements of penile corpora cavernosa. A detailed study concerning these elements could contribute to a better understanding of the effects of priapism in the corpora cavernosa. The aim of this work was to evaluate, based on quantitative and qualitative methods, the structural changes in the penile corpora cavernosa of patients with ischemic priapism and compare these results with those found in the penile samples of age-matched controls.

Patients and Methods

The present work received institutional review committee approval and was carried out in accordance with the ethical standards of the responsible institutional committee on human experimentation.

Samples from 7 patients with ischemic priapism aged between 28 and 44 yearsold (mean = 38), underwent surgery to obtain a cavernosal-glandular shunt (Al-Ghorab technique) (16).

The priapism in the analyzed patients lasted from 48 to 72 hours (mean = 56), and it was the first episode in all cases. Minimally invasive techniques like puncture and cavernosal irrigation or injection of vasoconstrictor agents have been used without success before surgery.

None of the patients presented previous history of diabetes or hypertension, which could have led to alterations in the normal penile structure. Two cases (28.58%) were idiopathic and 5 cases (72.42%) were related to sickle cell disease.

The control group was composed of samples from corpora cavernosa obtained from autopsies, until 6 hours after death, of 7 age-matched subjects, who died of causes not related to the urogenital tract. The tissue samples of corpora cavernosa were immersed in PBS formalin fixative (pH 7.2) for 24 hours and then routinely processed for paraffin embedding.

Sections of 5- μ m thick were obtained and all samples were initially stained with Hematoxylin-Eosin and analyzed by a pathologist to confirm the tissue integrity. Then, the samples were processed using histochemical and immunohistochemical techniques, as follows: Masson's trichromic and Picrosirius red to evidence and quantify the collagen, and Weigert resorcin-fuscin with previous oxidation to demonstrate the elastic system fibers. Smooth muscle fibers were shown by Masson's trichromic and

immunohistochemical analysis. We used the anti-alpha actin antibody (Zimed Laboratories). All elements evaluated were quantified by stereological methods previous described (17). Briefly, for each individual and each histological staining technique, 10 sections of corpus cavernous were obtained, and for each section, 10 fields were analyzed. All images were photographed with a digital camera directly coupled to a microscope at X200. The volumetric density (V_v) of histological structures was then evaluated by superimposing an M-42 test system on the digital images following techniques that have been described in detail elsewhere (17). The non-paired Student's t-test was used to determine the differences between the groups.

Results

Table-1 shows the results of the different elements analyzed.

The stereological quantification in the corpora cavernosa showed that the Vv of smooth muscle fibers was significantly decreased in patients with priapism (Figure-1). In contrast, there was a significant parallel increase in the Vv of elastic system fibers in priapism patients (Figure-2). Also, a significant increase in Vv of collagen was found in patients with priapism when compared with controls. The qualitative analysis of Picrosirius red stain, observed under polarization, revealed the existence of diverse collagen types in the corpora cavernosa trabeculae, with a predominance of green color collagen (increased collagen turnover) in patients with priapism, and a predominance of red color collagen (stable collagen state) in the control group (Figure-3).

Discussion

In priapism, a sustained erection followed by no penile detumescence, corresponding to a breakdown in the physiology of erection, occurs (4,18).

Corpora cavernosa smooth muscle fibers are of utmost importance for normal erection and detumescence. Smooth muscle relaxation is necessary to achieve erection, whereas corpora cavernosa smooth muscle contraction is necessary to obtain detumescence (4). Muneer et al. reported that in priapism, the cavernous tissue suffers hypoxia, acidosis and glycolysis (18). Subsequently, an infiltration of inflammatory cells and proliferation of fibroblasts occur, resulting in necrosis of smooth muscle cells in the corpora cavernosa with development of different grades of fibrosis (7,18). The normal smooth muscle replacement by fibrosis, in most cases, should be directly involved in erectile dysfunction that often occurs in patients with priapism (6,16). According to Spycher et al. (19) and Muneer et al. (18), it is possible to observe a focal necrosis of smooth muscle cells and their transformation into fibroblast-like cells after 24 h of priapism development. These observations could explain the marked decrease in the muscular component that we found in the present study, when the patients were analyzed after more than 48 h of priapism evolution.

Interestingly, the elastic system fibers were also affected, showing a significant increase. We can speculate that the ischemia that causes the transformation of smooth muscle cells in fibroblast-like cells, could also be the cause of the increase in corpora cavernosa elastic fibers. This phenomenon could help to promote detumescence, which occurs in the penile tunica albuginea, where the fibers of the elastic system are

coresponsible for promoting detumescence (20). The response of elastic system fibers to different stimuli could be manifested in different ways. Costa et al., analyzing the elastic system fibers in a study on severe erectile dysfunction, in which patients with priapism were not included, showed that the elastic fibers were significantly decreased (21). This suggests that the reaction mechanism of elastic system fibers is a particular characteristic of ischemic priapism. The increase in corpora cavernosa collagen content was statistically significant in the patients studied; nevertheless, it was proportionally lower when compared to the other histological features assessed (elastic system and smooth muscle fibers). Collagen content showed an increase of 4.8%, with concomitant occurrence of fibrosis, which seems to occur in a relatively short period of time. Costa et al. (21) and Luanghot et al. (22), reported that there was no significant increase in collagen content in corpora cavernosa of their patients with erectile dysfunction. However, these studies did not focus on ischemic priapism as the etiological factor of erectile dysfunction. Tissue ischemia is a well known factor for stimulating collagen production. The transformation of smooth muscle cells in fibroblast-like cells, as described previously (19), could also play a significant role in this process, justifying the increase in collagen content in the patients studied.

The qualitative analysis of Picrosirius stain sections observed under polarization showed different collagen colors on the trabeculae of the corpora cavernosa, for priapism patients and controls. The predominance of green color collagen in patients with priapism would signify an increase in collagen turnover, with an active process of collagen formation. On the other hand, we found a predominance of red color collagen in controls, which implies a stable collagen state.

Our results demonstrated that ischemic priapism is associated with significant changes in corpora cavernosa components, mainly as regards

the occurrence of tissular fibrosis and decrease in smooth muscle cells. The alterations seem to appear at a very early stage, as observed in our study after the first 48 h of priapism evolution.

We know that the evolution period of ischemic priapism is the main risk factor for the development of erectile dysfunction (5,14). The analysis of our results morphologically corroborate that the treatment of ischemic priapism should be carried out at a very early stage, in order to restore penile tissue oxygenation, and possibly avoid the structural alterations observed.

Conclusion

The significant changes observed in corpora cavernosa extracellular matrix and smooth muscle cells, mainly smooth muscle decrease and elastic system fibers increase, as well as collagen alterations, could explain the frequent occurrence of erectile dysfunction found in patients with ischemic priapism.

Acknowledgements

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

Richard Medeiros, Rouen University Hospital Medical Editor, edited the manuscript.

Carla B. M. Gallo, BSc, processed all images for this manuscript.

References

1. Burnett AL, Bivalacqua TJ. Priapism: current principles and practice. *Urol Clin North Am* 2007; 34: 631-642.
2. Chow K, Payne S. The pharmacological management of intermittent priapismic states. *BJU Int.* 2008; 102: 1515-1521.
3. Yuan J, Desouza R, Westney OL, Wang R. Insights of priapism mechanism and rationale treatment for recurrent priapism. *Asian J Androl.* 2008; 10: 88-101.
4. Van der Horst C, Stuebinger H, Seif C, Melchior D, Martinez-Portillo FJ, Juenemann KP. Priapism - etiology, pathophysiology and management. *Int Braz J Urol* 2003; 29: 391-400.
5. Minardi D, Milanese G, Galosi AB, Donatelli G, Muzzonigro G. Persistent priapism and histological modifications of the erectile tissue. Two case reports. *Arch Ital Urol Androl* 2004; 76: 97-99.
6. Pryor J, Akkus E, Alter G, Jordan G, Lebret T, Levine L, et al. Priapism. *J Sex Med* 2004; 1: 116-120.
7. Ralph DJ, Garaffa G, Muneer A, Freeman A, Rees R, Christopher AN, et al. The Immediate insertion of a penile prosthesis for acute ischaemic priapism. *Eur Urol* 2008, Oct 1 [Epub ahead of print].
8. Lue TF, Hellstrom WJ, McAninch JW, Tanagho EA. Priapism: a refined approach to diagnosis and treatment. *J Urol* 1986; 136: 104-108.
9. Pohl J, Pott B, Kleinhans G. Priapism: a three-phase concept of management according to aetiology and prognosis. *Br JUrol* 1986; 58: 113-118.
10. Juenemann KP, Lue TF, Abozeid M, Hellstrom WJ, Tanagho EA. Blood gas analysis in drug-induced penile erection. *Urol Int* 1986; 41: 207-211.

11. Sharpsteen JR Jr., Powars D, Johnson C, Rogers ZR, Williams WD, Posch RJ. Multisystem damage associated with tricorporal priapism in sickle cell disease. *Am J Med* 1993; 94: 289-295.
12. Adeyolu AB, Olujohungbe AB, Morris J, Yardumian A, Bareford D, Akenova A, et al. Priapism in sickle-cell disease; incidence, risk factors and complications – an international multicentre study. *BJU Int* 2002; 90: 898-902.
13. Emond AM, Holman R, Hayes RJ, Serjeant GR. Priapism and impotence in homozygous sickle cell disease. *Arch Intern Med* 1980; 140: 1434-1437.
14. El-Bahnasawy MS, Dawood A, Farouk A. Low-flow priapism: risk factors for erectile dysfunction. *BJU Int* 2002; 89: 285-290.
15. Brant WO, Garcia MM, Bella AJ, Chi T, Lue TF. T-Shaped Shunt and Intracavernous Tunneling for Prolonged Ischemic Priapism. *J Urol*. 2009, Feb 20 [Epub ahead of print].
16. Ercole CJ, Pontes JE, Pierce JM, Jr. Changing surgical concepts in the treatment of priapism. *J Urol* 1981; 125: 210-1.
17. Costa WS, Rebello SB, Cardoso LE, Cavalcanti AG, Sampaio FJ. Stereological and biochemical analysis of muscular and connective tissue components in the penile corpus cavernosum adjacent to the fibrous plaque of Peyronie's disease. *BJU Int* 2008; 103: 212-216.
18. Muneer A, Celtek S, Dogan A, Kell PD, Ralph DJ, Minhas S. Investigation of cavernosal smooth muscle dysfunction in low flow priapism using an in vitro model. *Int J Impot Res* 2005; 17: 10-18.
19. Spycher MA, Hauri D. The ultrastructure of the erectile tissue in priapism. *J Urol* 1986; 135: 142-147.
20. Hsu GL, Brock G, Von Heyden B, Nunes L, Lue TF, Tanagho EA. The distribution of elastic fibrous elements within the human penis. *Br J Urol* 1994; 73: 566-571.

21. Costa WS, Carrerete FB, Horta WG, Sampaio FJ. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU Int* 2006; 97: 567-569.
22. 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* 1992; 148: 467-471.

Table 1 – Stereological analysis of smooth muscle cells, elastic system fibers and collagen fibers, in corpora cavernosa of patients with ischemic priapism and controls.

	Smooth Muscle Fibers %		Elastic System Fibers %		Collagen %	
	Priapism	Control	Priapism	Control	Priapism	Control
Mean	26.48	43.37	36.10	28.10	39.64	34.76
SD	5.00	4.96	3.06	2.85	2.91	4.64
p Value	< 0.0001		0.0012		0.0019	

SD = standard deviation

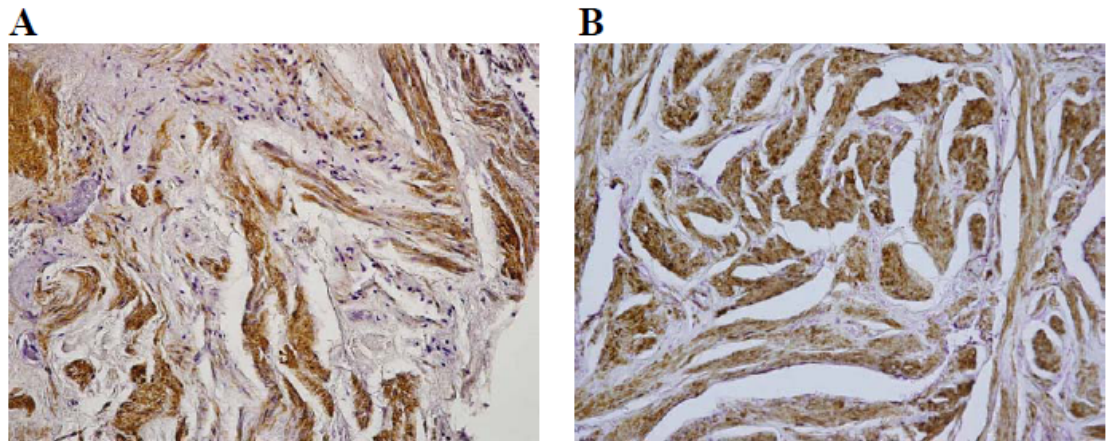


Figure 1 - Smooth muscle cells in corpora cavernosa. **A)** Priapism, **B)** Control. This shows a decrease in smooth muscle cells in patients with priapism when compared to controls.

Immunohistochemistry with anti-human alpha-actin. X200.

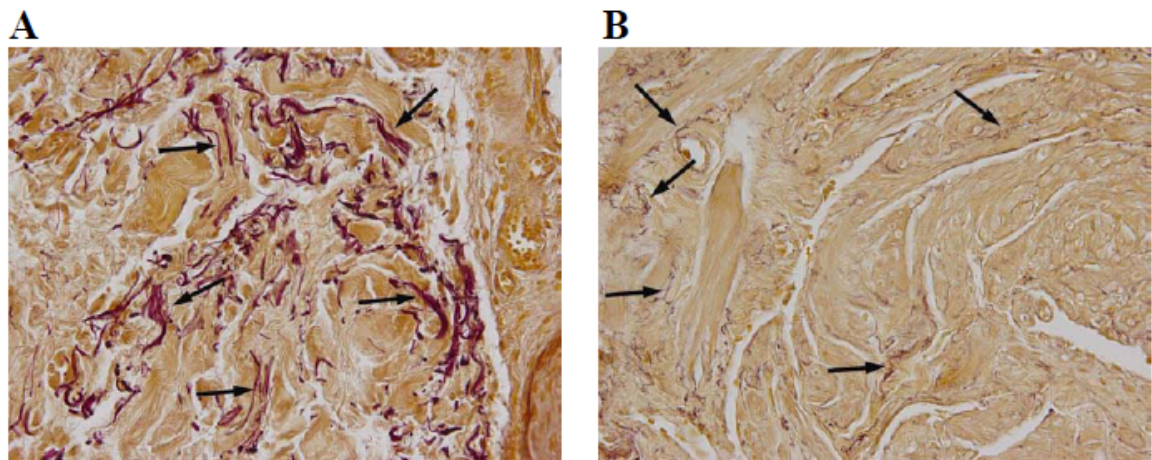


Figure 2 - Elastic system fibers in corpora cavernosa. **A)** Priapism, **B)** Control group. This shows an increase in elastic fibers (arrows) in patients with priapism when compared to controls.

Weigert's resorcin-fuchsin, X400.

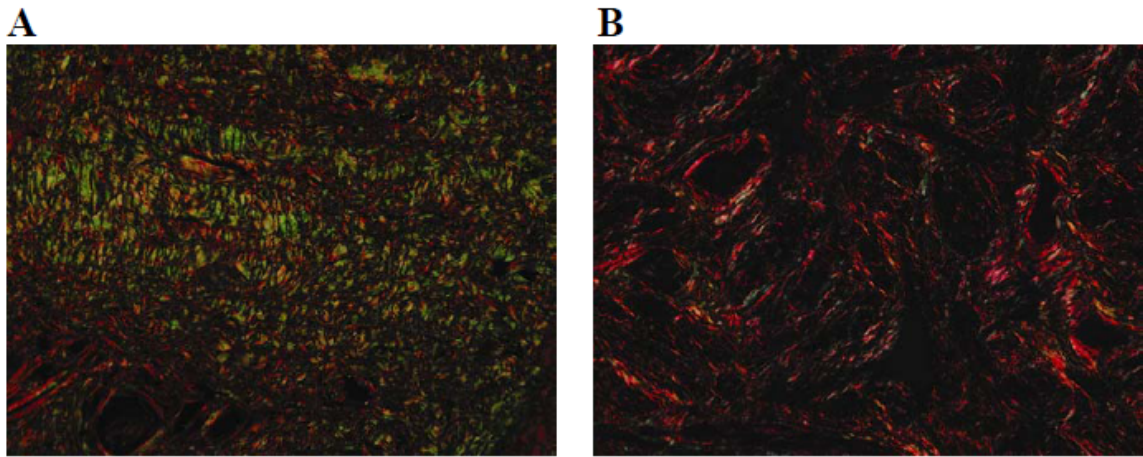


Figure 3 - Collagen in corpora cavernosa. **A)** Priapism, **B)** Control group. This shows a predominance of red color in the control group, while in the priapism group there is a predominance of green color. Picrosirius red observed under polarization, X200.

SHORT-TERM EFFECTS OF RADIATION ON THE DENSITY AND STRUCTURAL ORGANIZATION OF SMOOTH MUSCLE AND CONNECTIVE TISSUE IN THE CORPUS CAVERNOSUM OF RATS SUPPLEMENTED WITH L-GLUTAMINE

Francisco J.B. SAMPAIO, José G.A. RIBEIRO, Waldemar S. COSTA, Jorge L. MEDEIROS JR., Bruno FELIX, Rodolfo ACATAUASSÚ, Luiz E.M. CARDOSO*

Urogenital Research Unit and University Center for Cancer Control, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Running title: Effects of radiation on the rat penis

Keywords: penis, corpus cavernosum, rat, glutamine, radiotherapy

*Corresponding author:

Luiz E.M. Cardoso, MD, PhD
Urogenital Research Unit – UERJ
Av. 28 de Setembro, 87 – fundos - FCM - térreo
Rio de Janeiro, RJ, 20551-030, BRAZIL
Telephone: (55 21) 2587-6117
Fax: (55 21) 2587-6121
E-mail: luizemcardoso@gmail.com

Number of:

Text pages: 18

Figures: 2

Word count of abstract: 248

ABSTRACT

Data on the side effects of pelvic radiotherapy on penile tissue are mostly qualitative and long-term, and lack information on the extracellular matrix. Here we quantitated the short-term effects of pelvic radiation on the trabeculae of the rat corpus cavernosum and investigated whether L-glutamine (GLN), which protects intestinal tissue against radiation-induced lesions, has similar effects on the penis. Groups of adult Wistar rats containing ten animals each received: (a) no radiation and no GLN, and were used as controls; (b) one dose of radiation; and (c) radiation and GLN supplementation. All animals were sacrificed seven days after radiation. The penile proximal shaft was paraffin embedded and stained with Masson's trichrome for smooth muscle and connective tissue, and with Weigert's resorcin-fuchsin for elastic fibers. Stereological quantitations were done as volume fraction (Vv). Collagen organization was measured as a red/green ratio using the Picrosirius-polarization staining method and color analysis software. After radiation, Vv of smooth muscle increased by 40.8% compared with controls ($13.62 \pm 2.96\%$ vs $9.67 \pm 2.52\%$; $p < 0.05$), while Vv of connective tissue and of elastic fibers were unchanged among the groups. The collagen red/green ratio was reduced by 54.1% in animals submitted to radiation only (6.10 ± 2.69 vs 2.80 ± 1.27 ; $p < 0.05$). None of these changes were prevented by GLN supplementation. In conclusion, these short-term cavernosal alterations following pelvic radiation imply early inflammatory and repair reactions which might affect the normal functioning of the erectile tissue. GLN does not prevent these injuries.

INTRODUCTION

External beam radiation therapy has been a mainstay in the management of malignant tumors of the pelvis (1). Although the anatomical area receiving the treatment is calculated to be as restricted as possible to reduce side effects, tissues adjacent to the target tumor may nonetheless be affected. In the case of prostate cancer, structures such as the small and large bowels (2) and the genitourinary tract (3) are often and undesirably injured by radiation. As a consequence, gastrointestinal and genitourinary complications may occur, in addition to pelvic abscesses and thrombophlebitis (4). The corpus cavernosum tissue and the hemodynamic properties of the penis may be altered as well (5,6,7,8), and complications include a high incidence of erectile dysfunction, which may affect as much as 59% of patients undergoing radiotherapy (8,9). In fact, attempts to optimize positioning and other physical parameters of radiation have been made specifically to decrease this incidence (10).

Ultrasonographic studies suggest that erectile dysfunction following pelvic radiotherapy has an arteriogenic cause (6,7) and involves mainly penile proximal structures (9). However, other factors may be at play, as physiological alterations in the erectile tissue itself have also been reported. For example, it has been shown that, in the corpus cavernosum, radiation affects the expression of myosin isoforms in humans (11) and the density of nitric oxide-positive nerves in rats (12). The corpus cavernosum also undergoes morphological alterations as a result of radiation, including irregularities in blood vessel wall, loss of endothelial cells (13), and a decrease in smooth muscle (12). These evaluations, however, are mostly qualitative and long-term, so that the magnitude, significance, and early course of the alterations are still unsettled. In addition, these investigations lack more detailed information on the trabecular extracellular matrix, whose integrity is pivotal for normal penile function during erection (14,15).

Part of these radiation-induced modifications in the penile tissue may be mediated by free radical stress, and treatment of rats with melatonin, a hormone with antioxidant and immunostimulatory activities, can revert acute phase damages to vascular walls in the corpus cavernosum (13).

Nutritional supplementation with certain aminoacids, administered before and after radiotherapy sessions, also protects against the deleterious effects of radiation. For example, experiments with irradiated rats have shown that L-glutamine, which enhances the healing of injured mucosae (16), prevents the appearance of early intestinal alterations (17,18). However, there is no data on whether this aminoacid can protect the corpus cavernosum from being injured by radiation.

The objective of this study was thus to assess the short-term effects of pelvic radiation on the corpus cavernosum of the rat penis. We focused the analysis on major cavernosal components that are involved in erection, such as smooth muscle cells and extracellular matrix fibrillar proteins, and used quantitative histological and image analysis techniques. We also investigated whether L-glutamine supplementation has protective effects against radiation-induced penile injuries.

MATERIALS AND METHODS

The Ethics Committee on Animal Research of the State University of Rio de Janeiro reviewed and approved this study.

Animals and treatments

Thirty male Wistar rats aged from three to four months were randomly assigned to one of the following groups of ten animals each: (a) controls, which consisted of non-irradiated, non-treated animals; (b) irradiated-only rats; and (c) irradiated rats receiving L-glutamine supplementation. Animal housing and maintenance conditions were as described elsewhere (18).

Previous investigations have characterized a rat model of single-dose, pelvico-abdominal radiation that causes extensive short-term morphological and functional damage to the intestinal tissue, most of which can be prevented by L-glutamine nutritional supplementation (17,18). These established experimental protocols of radiation and treatment were thus used herein to ascertain whether the penile tissue is also affected. Briefly, immobilized animals were exposed in one session to a total dose of 10 Gy using a 10 MeV photon beam generated by a linear accelerator (Clinac 2100C, Varian, Palo Alto, USA). The dose was delivered at a source-to-skin distance of 100 cm, at a rate of 2.4 Gy/minute for 4.16 minutes, and was aimed at the pelvico-abdominal region, whereas other fields were shielded off. L-glutamine (Resource Glutamine, Novartis, Rio de Janeiro, Brazil) was prepared as a 4% aqueous solution and was administered once a day by gavage at a dose of 0.65 g per kg of body weight, starting seven days before radiation and continuing until sacrifice. The groups that were not under L-glutamine supplementation received, also by gavage, a corresponding volume of water for the same period. All animals were sacrificed seven days after radiation by ether inhalation.

Tissue preparation and histological techniques

Shortly after sacrifice, the penile proximal shaft up to the flexure was excised, and from this segment the mid-third was obtained and used in all analyses. Thus, the region under study was located close to the penile basis. Samples were briefly rinsed in 0.9% NaCl, immediately fixed in 10% formalin prepared in PBS, and then routinely processed for paraffin embedding. Tissue sections were 5- μ m thick and were perpendicular to the long axis of the penile shaft. The sections were stained with Masson's trichrome for the detection of smooth muscle and connective tissue, and with Weigert's resorcin-fuchsin technique with previous oxidation by peracetic acid to label all fibers of the elastic fiber system (19). The arrangement and aggregation of the connective tissue was assessed by Picrosirius red (Direct Red 80, Sigma-Aldrich 365548, Saint Louis, MO, USA) staining followed by examination of sections under polarized light, which highlights collagen fibers in shades of yellow, orange, red, and green on a dark field background (19). The specificity of the histochemical staining of elastic fibers and smooth muscle was confirmed by immunolabeling with antibodies against elastin (monoclonal, E 4013, Sigma, Saint Louis, MO, USA) and smooth muscle alpha actin (Zymed Laboratories, 08-0106 predilute antibody, Carlsbad, CA, USA), respectively, as previously described (20).

Image analysis and stereology

All tissue sections were photographed under the same conditions and at a resolution of 2040 X 1536 pixels, with a digital camera (Olympus DP70, Tokyo, Japan) directly coupled to the microscope (Olympus BX51, Tokyo, Japan), and stored in a TIFF file format.

In sections treated by the Picrosirius-polarization method and captured at a final magnification of X200, the surface area occupied by the different color birefringences of collagen were separately measured using a color-based computer technique (21). Thus, these areas were determined as the number of pixels in either the yellow-orange-reddish (R) or greenish (G) color ranges. For each image, a R/G ratio was then calculated by dividing these two areas. Five random fields were analyzed per animal, from which a mean individual ratio was calculated.

Stereological evaluation of the contents of smooth muscle and connective tissue was carried out at a final magnification of X200, while for elastic fibers images were captured at X1000. The ImageJ version 1.41 software (NIH, Bethesda, USA), loaded with its own Grid_.class plugin (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/>), was used to generate a grid probe containing 100 points, which was superimposed on the digital photographs of the corpus cavernosum so as to totally include the cavernosal tissue but excluding the tunica albuginea. Thus the reference space included only trabeculae and sinusoids. Volume fraction (V_v) of cavernosal smooth muscle, connective tissue, and elastic fibers was then determined by point counting and expressed as percent of the reference space (22). Each stereological variable was measured on five random fields per section, and on five sections per animal. The 25 values thus obtained were then used to determine the individual mean value for each animal, from which group means were calculated.

Statistics

Statistical procedures followed Sokal and Rohlf (23). Differences among groups for each of the quantitative parameters were analyzed by one-way ANOVA, which was followed by pairwise planned comparisons using the Bonferroni method for multiple comparisons. All results are reported as means \pm their standard deviations (SD), and statistical significance was considered when $p < 0.05$.

RESULTS

The Vv of cavernosal smooth muscle was significantly affected by the experimental conditions ($p < 0.025$) (fig. 1A). Thus, after radiation, the relative amount of smooth muscle increased by 40.8% compared with control animals ($13.62 \pm 2.96\%$ vs $9.67 \pm 2.52\%$; $p < 0.05$). In irradiated animals supplemented with glutamine, smooth muscle Vv was increased by a similar amount ($15.27 \pm 3.86\%$; $p < 0.05$) with regard to controls, but this value was not significantly different from that of irradiated-only animals. Therefore, enlargement of smooth muscle in the corpus cavernosum induced by radiation was not prevented by glutamine supplementation.

Vv of connective tissue as a whole (fig. 1B) and of elastic fibers (fig. 1C) in the cavernosal tissue were unchanged among the groups. Thus, irradiated-only animals had similar values of connective tissue ($63.18 \pm 4.97\%$) and elastic fibers ($19.31 \pm 3.57\%$) compared with the controls (61.39 ± 6.01 and $18.31 \pm 2.11\%$, respectively). In irradiated animals which received glutamine supplementation, connective tissue ($65.28 \pm 9.85\%$) and elastic fibers ($19.65 \pm 3.93\%$) were likewise unaffected as compared with the non-irradiated and irradiated-only groups.

The organization of collagen was investigated by staining corpus cavernosum samples with Picrosirius red and observing the tissue sections under polarized light. The obtained images revealed that, in the irradiated groups (figs. 2B and 2C), the relative amount of greenish birefringence was greater than in control animals (fig. 2A). Also, the color patterns of the two irradiated groups were essentially similar. These findings were confirmed by using color-based computer analysis to quantitate the surface area occupied by the different colors produced by this staining technique. The results were calculated as a R/G ratio, which showed that the organization of cavernosal collagen fibers was significantly affected in the irradiated groups ($p < 0.005$) (fig. 1D). Accordingly, and compared with the controls, this ratio was reduced by 54.1% in the animals that were submitted to radiation only (6.10 ± 2.69 vs 2.80 ± 1.27 ; $p < 0.05$). Values for the irradiated animals receiving glutamine supplementation (2.60 ± 0.98) were not significantly different from this latter group, but

were similarly reduced ($p < 0.05$) compared with controls. Thus, and as with smooth muscle, radiation led to changes in the organization of cavernosal collagen, but this effect was not prevented by glutamine supplementation.

[FIGURE 1]

Figure 1. Histological analysis of the rat corpus cavernosum using quantitative methods. The relative amounts of smooth muscle (A), connective tissue (B), and elastic fibers (C) were determined by point counting on a stereological grid and are expressed as volume fraction (%) of cavernosal tissue. The arrangement of collagen (D) was determined by color-based image analysis of sections stained by the Picrosirius-polarization method and is expressed as a ratio between the yellow-orange-reddish and greenish areas (R/G). Bars represent mean and standard deviation of ten animals each in the control (Contr), irradiated only (Irrad), and irradiated plus glutamine supplementation (Irrad+Glu) groups. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by pairwise comparisons using the Bonferroni test. (*) indicates significantly different from the control group, $p < 0.05$.

[FIGURE 2]

Figure 2. Arrangement and organization of collagen in the trabeculae of the rat corpus cavernosum as revealed by the Picrosirius-polarization method. Collagen fibers are specifically highlighted in shades of yellow, orange, reddish, and greenish birefringence as shown in representative sections from animals in the control (A), irradiated only (B), and irradiated plus glutamine supplementation (C) groups. The dark field background is the vascular lumen of the cavernosal sinusoids. Images were captured at an original magnification of X200, and the scale bar represents 100 μm .

DISCUSSION

The trabeculae of the corpus cavernosum are made up of endothelial cells, smooth muscle cells, and a dense extracellular matrix that contains mostly fibrillar proteins such as collagen and elastic fibers (20,24,25). These components play important and different roles during erection, and alterations in their structural organization is thought to be one of the key pathophysiological events underlying erectile dysfunction (14). Relaxation of trabecular smooth muscle, for example, is one of the initial steps of normal erection, elevating blood flow and pressure in the cavernosal vascular spaces (15).

Trabecular smooth muscle, however, was significantly increased seven days after one dose of radiation aimed at the pelvic region, as shown by our results. On the other hand, in the long run the effects may be different, as findings using this same rat model showed that smooth muscle in the corpus cavernosum was visually decreased five months after a single dose of radiation (12). Thus, our results showing an enlargement of smooth muscle may be a short-term effect of radiation on the cells of this tissue. Indeed, if arterial tissue is subjected to radiation, the resulting acute injuries are marked by an enhanced release of the mitogen PDGF and by an ensuing smooth muscle cell proliferation (26). Because the corpus cavernosum is a vascular tissue and cavernosal cells in the rat express PDGF subunits and receptor (27), a similar inflammatory mechanism might be responsible for the increase in smooth muscle in our irradiated animals.

In addition to affecting relaxation of the corpus cavernosum, this short-term increase in trabecular smooth muscle cells may have other negative impacts on erection. Accordingly, we have shown previously that these cells in the rat corpus cavernosum are arranged as a subendothelial layer, whereas in humans they are more homogeneously distributed in the trabeculae (20). Further, preliminary data obtained in our laboratory indicate that, in the aged rat, when there is already a loss of sexual function (28), this smooth muscle layer is markedly thicker and the sinusoidal vascular space is diminished (29). As the amount of trabecular connective tissue and of elastic fibers was unchanged in the irradiated groups, as per our results, the 40% increase in smooth muscle after this

treatment should lead to a corresponding reduction in the lumen of the cavernosal sinusoids. This alteration should then have adverse effects on blood flow and other erection-related characteristics of the corpus cavernosum. Indeed, clinical exams indicate that there are hemodynamic changes in the corpus cavernosum of men who have been submitted to pelvic radiation therapy for prostate cancer (7).

As mentioned above, smooth muscle relaxation is necessary to initiate erection. Once the corpus cavernosum starts to expand, its noncircular cross section is maintained by the trabeculae, thereby decreasing compressive forces that are exerted on the corpus spongiosum (15). This function of the trabeculae of limiting expansion should therefore depend directly on the non-distensible collagen fibers thereof. However, and although the overall amount of trabecular connective tissue was unchanged by radiation, our results using the Picrosirius-polarization method revealed a significant shift in the staining pattern from yellow-orange-reddish to a more greenish birefringence. This staining change typically occurs in places of the connective tissue that are undergoing collagen degradation and/or repair due to recent injury and inflammatory process, and is indicative of a looser matrix (19,30,31). Thus, such an alteration in the cavernosal collagen fibers as a result of radiation might impair the expansion limiter function of the trabeculae, which would in turn compromise the inflation and normal functioning of the urethra during copulation.

A radiation model similar to the one used in the present investigation induced vascular alterations in the rat penis, and the fact that antioxidant treatment prevented these lesions strongly indicates that they are mediated by free radicals (13). Moreover, it has been shown both in vivo (32) and in vitro (33) that free radicals can directly degrade collagen fibers. Because our results suggest an enhanced turnover of trabecular collagen following pelvic radiation, this alteration in the corpus cavernosum might be mediated, at least in part, by free radicals. It should also be mentioned that an acutely degraded and/or disrupted extracellular matrix should lead, in the long run, to the formation of a fibrotic tissue. Interestingly, a Peyronie's disease patient submitted to radiotherapy presented extensive fibrosis in the corpus cavernosum five months after treatment (5).

In general, complications or side effects of radiotherapy are treated conventionally, but occasionally surgical intervention is necessary (4). There is more recent experimental evidence, however, indicating that treatment with certain aminoacids may have a protective effect against radiation-induced injuries. For example, investigations using the same radiation protocol as described herein have shown that nutritional supplementation with L-glutamine alone protects against intestinal injuries in rats. Thus, this aminoacid caused a marked decrease in bacterial invasion into the intestinal wall and prevented decreases in the height and density of jejunal/ileal villi and in the thickness of the colonic mucosa (17). L-glutamine also prevented a decrease in the thickness of the colonic wall (18).

In spite of its beneficial effects on the intestinal wall, L-glutamine did not prevent the adverse effects of radiation on cavernosal smooth muscle and collagen, as shown by our results. When comparing these effects, however, differences between the intestinal wall and the corpus cavernosum should be taken into account. The short-term protective effects on the intestinal epithelium may be attributed to a topical effect of L-glutamine, which itself stimulates proliferation of these cells (16). Such an effect is less likely to affect cells in the corpus cavernosum. On the other hand, a protection against a decrease in the volume of both the colonic wall and of its smooth muscle layers (18) suggests a more systemic effect of L-glutamine. This aminoacid, however, was ineffective in preventing smooth muscle enlargement in the corpus cavernosum after radiation. Such a differential effect of L-glutamine might be attributed to a metabolic heterogeneity among smooth muscle cells, which are known to have different proliferative responses and react differently to drugs depending on their tissue of origin (34).

In conclusion, the short-term adverse effects of pelvic radiation on the rat corpus cavernosum include smooth muscle growth and a disruption of trabecular collagen. These alterations imply early inflammatory and repair reactions which may affect the normal functioning of the erectile tissue. L-glutamine, which protects intestinal tissue against radiation, did not prevent these injuries.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil.

REFERENCES

- 1 - Montie, J.E., Hussain, M. (2007) Outcomes for radiation therapy after radical prostatectomy for prostate cancer: what really matters? *BJU Int.* **100**: 485-486.
- 2 - Faria, S.L., Souhami, L., Joshua, B., Vuong, T., Freeman, C.R. (2008) Reporting late rectal toxicity in prostate cancer patients treated with curative radiation treatment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **72**: 777-781.
- 3 - Pinkawa, M., Fishedick, K., Asadpour, B., Gagel, B., Piroth, M.D., Eble, M.J. (2006) Low-grade toxicity after conformal radiation therapy for prostate cancer--impact of bladder volume. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **64**: 835-841.
- 4 - Perez, C.A., Breaux, S., Bedwinek, J.M., Madoc-Jones, H., Camel, H.M., Purdy, J.A., Walz, B.J. (1984) Radiation therapy alone in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. II. Analysis of complications. *Cancer* **54**: 235-246.
- 5 - Hall, S.J., Basile, G., Bertero, E.B., de las Morenas, A., Goldstein, I. (1995) Extensive corporeal fibrosis after penile irradiation. *J. Urol.* **153**: 372-377.
- 6 - Zelefsky, M.J., Eid, J.F. (1998) Elucidating the etiology of erectile dysfunction after definitive therapy for prostatic cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **40**: 129-133.
- 7 - Mulhall, J., Ahmed, A., Parker, M., Mohideen, N. (2005) The hemodynamics of erectile dysfunction following external beam radiation for prostate cancer. *J. Sex Med.* **2**: 432-437.
- 8 - Pinkawa, M., Gagel, B., Piroth, M.D., Fishedick, K., Asadpour, B., Kehl, M., Klotz, J., Eble, M.J. (2009) Erectile dysfunction after external beam radiotherapy for prostate cancer. *Eur. Urol.* **55**: 227-236.
- 9 - van der Wielen, G.J., Mulhall, J.P., Incrocci, L. (2007) Erectile dysfunction after radiotherapy for prostate cancer and radiation dose to the penile structures: a critical review. *Radiother. Oncol.* **84**: 107-113.
- 10 - McLaughlin, P.W., Narayana, V., Meirovitz, A., Troyer, S., Roberson, P.L., Gonda, R. Jr, Sandler, H., Marsh, L., Lawrence, T., Kessler, M. (2005) Vessel-sparing prostate radiotherapy: dose limitation to critical erectile vascular structures (internal pudendal artery and corpus cavernosum) defined by MRI. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **61**: 20-31.
- 11 - Koi, P.T., Milhoua, P.M., Monroe, V., Melman, A., DiSanto, M.E. (2007) Expression of myosin isoforms in the smooth muscle of human corpus cavernosum. *Int. J. Impot. Res.* **19**: 62-68.
- 12 - Carrier, S., Hricak, H., Lee, S.S., Baba, K., Morgan, D.M., Nunes, L., Ross, G.Y., Phillips, T.L., Lue, T.F. (1995) Radiation-induced decrease in nitric oxide synthase--containing nerves in the rat penis. *Radiology* **195**: 95-99.
- 13 - Sener, G., Atasoy, B.M., Ersoy, Y., Arbak, S., Sengoz, M., Yegen, B.C. (2004) Melatonin protects against ionizing radiation-induced oxidative damage in corpus cavernosum and urinary bladder in rats. *J. Pineal Res.* **37**: 241-246.
- 14 - Moreland, R.B. (2000) Pathophysiology of erectile dysfunction: the contributions of trabecular structure to function and the role of functional antagonism. *Int. J. Impot. Res.* **12**: S39-S46.
- 15 - Kelly, D.A. (2007) Penises as variable-volume hydrostatic skeletons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*

1101: 453-463.

16 - Klimberg, V.S., Salloum, R.M., Kasper, M., Plumley, D.A., Dolson, D.J., Hautamaki, R.D., Mendenhall, W.R., Bova, F.C., Bland, K.I., Copeland, E.M. 3rd, et al. (1990) Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole abdominal radiation. *Arch. Surg.* **125:** 1040-1045.

17 - Ersin, S., Tuncyurek, P., Esassolak, M., Alkanat, M., Buke, C., Yilmaz, M., Telefoncu, A., Kose, T. (2000) The prophylactic and therapeutic effects of glutamine- and arginine-enriched diets on radiation-induced enteritis in rats. *J. Surg. Res.* **89:** 121-125.

18 - Diestel, C.F., Marques, R.G., Lopes-Paulo, F., Paiva, D., Horst, N.L., Caetano, C.E., Portela, M.C. (2007) Role of L-glutamine and glycine supplementation on irradiated colonic wall. *Int. J. Colorectal Dis.* **22:** 1523-1529.

19 - Montes, G.S. (1996) Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol. Int.* **20:** 15-27.

20 - Pinheiro, A.C.A.D., Costa, W.S., Cardoso, L.E.M., Sampaio, F.J.B. (2000) Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen, and elastic fibers in the corpus cavernosum of the rat penis. *J. Urol.* **164:** 1802-1806.

21 - Lehr, H.A., van der Loos, C.M., Teeling, P., Gown, A.M. (1999) Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using Photoshop-based image analysis. *J. Histochem. Cytochem.* **47:** 119-126.

22 - Gundersen, H.J., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sørensen, F.B., Vesterby, A., et al. (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96:** 379-394.

23 - Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995) *Biometry*. 3rd ed. W.H. Freeman, New York, 887 pp.

24 - Bastos, A.L., Costa, W.S., Cardoso, L.E., Sampaio, F.J. (1999) Collagen and elastic fibers in the penis of human fetuses at 28 weeks postconception. *Eur. Urol.* **36:** 158-163.

25 - Bastos, A.L., Sampaio, F.J., Cardoso, L.E. (2005) Compositional changes of collagen and glycosaminoglycans in the tunica albuginea and corpus cavernosum from the human penis during the fetal and postnatal periods. *J. Urol.* **173:** 1039-1043.

26 - Sinzinger, H., Firbas, W. (1985) Irradiation depresses prostacyclin generation upon stimulation with the platelet-derived growth factor. *Br. J. Radiol.* **58:** 1023-1026.

27 - Aversa, A., Basciani, S., Visca, P., Arizzi, M., Gnassi, L., Frajese, G., Fabbri, A. (2001) Platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptors in rat corpus cavernosum: changes in expression after transient in vivo hypoxia. *J. Endocrinol.* **170:** 395-402.

28 - Saito, T.R., Terada, M., Moritani, N., Hashimoto, H., Oikawa, T., Soeta, S. (2003) Developmental expression of penile reflexes and copulatory behavior in male rats. *Exp. Anim.* **52:** 153-157.

29 - Machado, F.A., Costa, W.S., Souza, A., Sampaio, F.J.B., Cardoso, L.E.M. (2008) Age-related modifications in the structural organization of the trabeculae and endothelial region in the corpus cavernosum of the rat penis. *J. Urol.* **179** Suppl: 337.

30 - Burke, A.P., Kolodgie, F.D., Farb, A., Weber, D.K., Malcom, G.T., Smialek, J., Virmani, R.

(2001) Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* **103**: 934-940.

31 - Borges, L.F., Gutierrez, P.S., Marana, H.R., Taboga, S.R. (2007) Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron* **38**: 580-583.

32 - Trenam, C.W., Dabbagh, A.J., Morris, C.J., Blake, D.R. (1991) Skin inflammation induced by reactive oxygen species (ROS): an in-vivo model. *Br. J. Dermatol.* **125**: 325-329.

33 - Arisawa, S., Arisawa, T., Ohashi, M., Nitta, Y., Ikeya, T., Asai, J. (1996) Effect of the hydroxyl radical on fibroblast-mediated collagen remodelling in vitro. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **23**: 222-228.

34 - Rodat-Despoix, L., Crevel, H., Marthan, R., Savineau, J.P., Guibert, C. (2008) Heterogeneity in 5-HT-induced contractile and proliferative responses in rat pulmonary arterial bed. *J. Vasc Res.* **45**: 181-192.

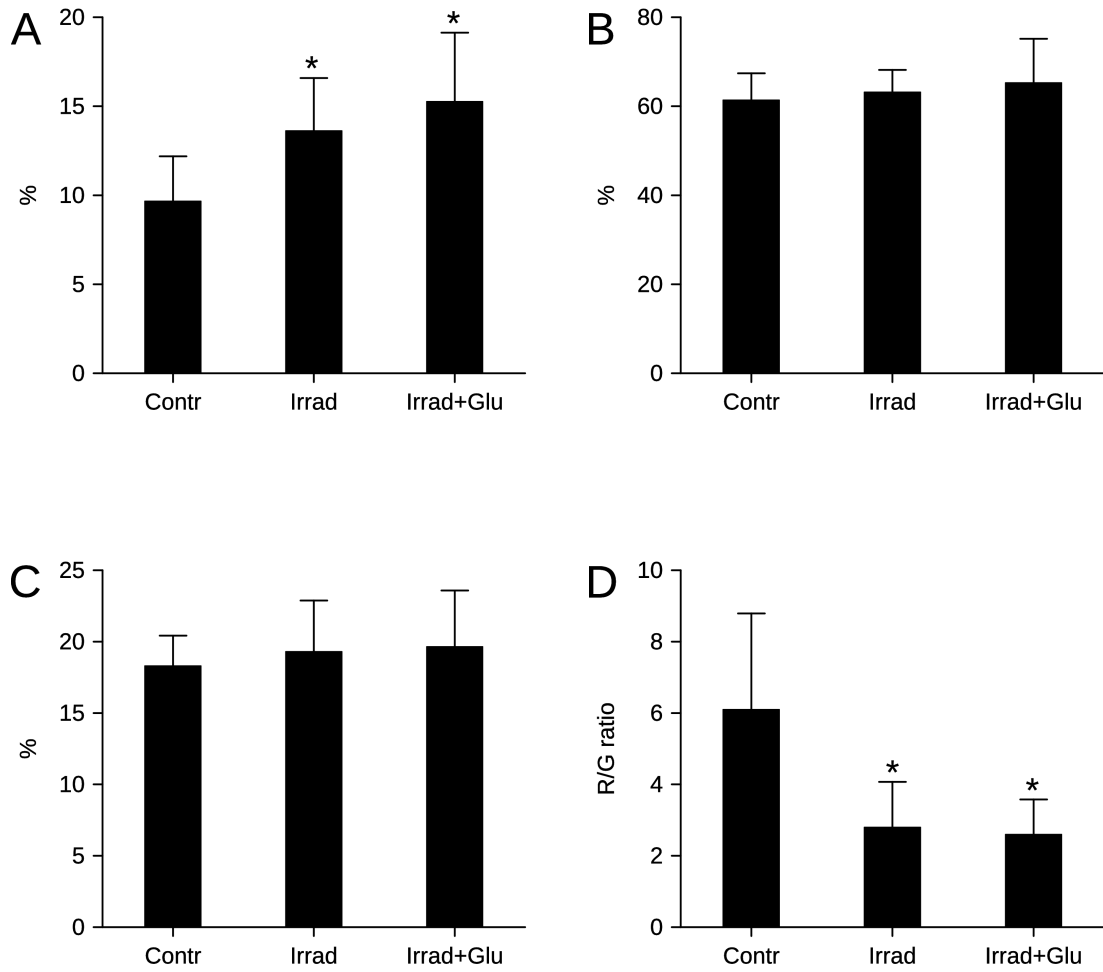


Figure 1

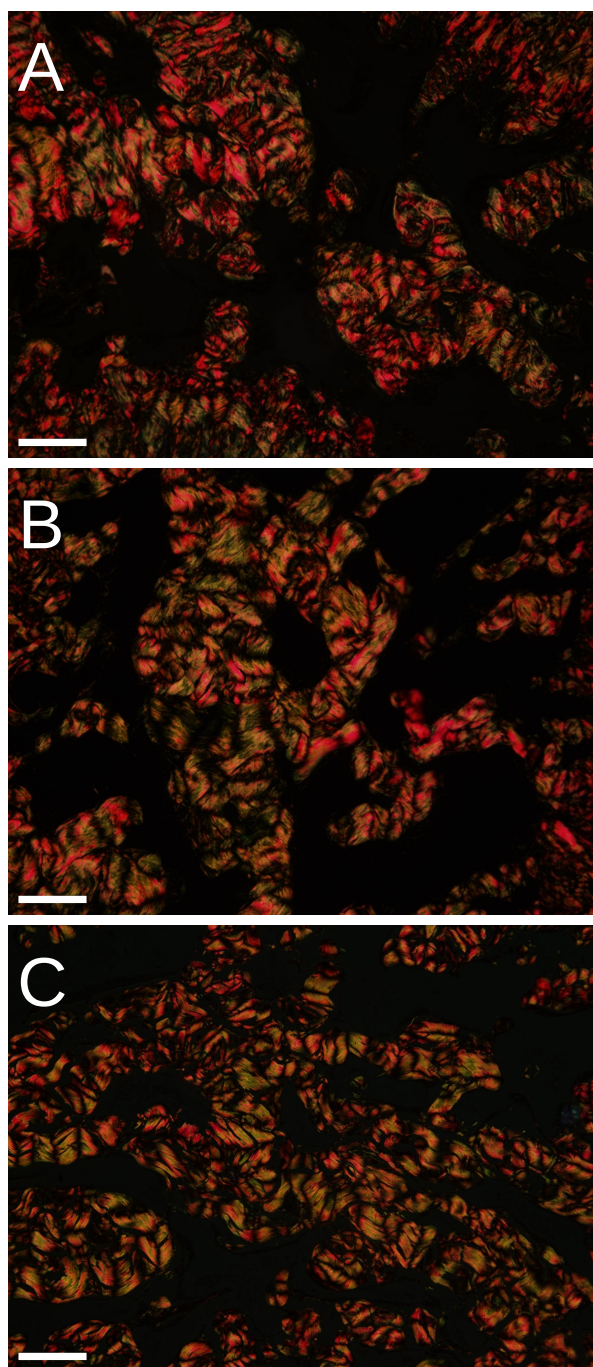


Figure 2