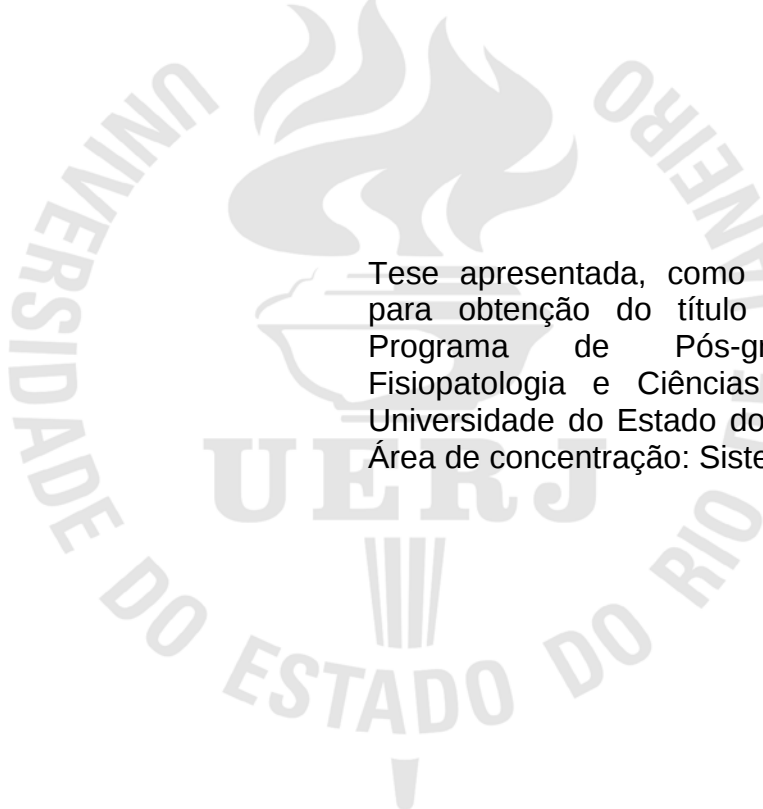


João Paulo Martins de Carvalho

**Estudo estrutural e ontogenético do pênis de fetos humanos normais e
anencéfalos no segundo trimestre de gestação**



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

Orientador: Prof. Dr. Luciano Alves Favorito

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB



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

Assinatura

Data

João Paulo Martins de Carvalho

Estudo estrutural e ontogenético do pênis de fetos humanos normais e anencéfalos no segundo trimestre de gestação

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Aprovada em 14 de dezembro de 2011.

Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. Aguinaldo César Nardi
Universidade do Estado de São Paulo

Prof. Dr. Alfredo Felix Canalini
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Valter Javaroni
Hospital Federal de Bonsucesso

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

À minha querida esposa Natasha, por todos estes anos de amor e tolerância.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luciano, pelo estímulo desde os tempos de residência médica e a sua confiança em nossa capacidade de aprendizado.

A todos os Professores da Pós Graduação, em especial Francisco Sampaio e Waldemar Costa, por estes anos de paciência e dedicação.

Aos amigos do Mestrado e Doutorado, todos eles. Sem a sua ajuda, nada disso seria possível.

RESUMO

Carvalho, João Paulo Martins de,. *Estudo estrutural e ontogenético do pênis de fetos humanos normais e anencéfalos no segundo trimestre de gestação* . 2011. 137f.

Tese, Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Introdução- A anencefalia é o Defeito do Tubo Neural (DTN) mais severo em fetos humanos. Há uma demanda crescente para reposição tissular em doenças crônicas e cirurgias reconstrutoras. Tecidos fetais têm sido utilizados como substitutos para órgãos sólidos. Objetivo- Comparar a estrutura e morfologia do corpo cavernoso e corpo esponjoso de pênis de fetos humanos anencéfalos e de controle a fim de propor um novo modelo para estudos biológicos e transplantes teciduais. Métodos- Foram estudados 11 pênis de fetos de controle de 14 a 23 Semanas Pós Concepção (SPC), e cinco pênis de fetos anencéfalos de 18 a 22 SPC. Os órgãos foram removidos e processados pelas técnicas histo e imunohistoquímicas rotineiras. A análise do tecido conjuntivo, células musculares lisas e fibras elásticas foram realizadas em lâminas dos espécimes. Os dados foram expressos em Densidade de área (Da) utilizando-se um software de processamento digital. As médias foram comparadas utilizando-se o Teste – T não pareado e quando aplicável, a regressão linear simples foi utilizada. Foi considerada significância estatística se $p < 0,05$. Resultados- O septo intercavernoso encontrava-se presente em todas as amostras. Não foram observadas diferenças da Da do tecido colágeno e musculatura lisa dos pênis de fetos anencéfalos quando comparados aos normais. A regressão linear simples sugere que durante o desenvolvimento humano há um aumento gradual do tecido colágeno ($R^2=0,45$) e uma diminuição da musculatura lisa ($R^2=0,62$) no corpo cavernoso de ambos os grupos. A elastina encontrava-se presente apenas em fetos a partir da 20ª SPC. Conclusões- Não houve diferença na estrutura da genitália entre fetos normais e anencéfalos. A presença da elastina em fetos a partir da 20ª SPC é um dado objetivo da manutenção da capacidade de ereção nestes grupos. A histo e imunohistoquímica sugerem que o desenvolvimento do pênis destes fetos encontra-se inalterado. Futuros estudos deverão ser realizados com o objetivo de avaliar fetos anencéfalos como um potencial grupo de doadores teciduais e um adequado modelo para estudos biológicos.

Palavras-chave: pênis, tecido erétil, anencefalia, embriologia, fetos humanos.

ABSTRACT

Introduction- Anencephaly is the most severe neural tube defect (NTD) in human fetuses. There is an increasing need for tissue replacement in chronic diseases and reconstructive surgeries. Fetal tissues have been used as a substitute for native organs. **Aim-** Compare the structure and morphology of the corpora cavernosa and spongiosum of penises from anencephalic and normal human fetuses to propose a new model for biological studies and tissue transplantation. **Methods-** We studied 11 penises from normal human fetuses, aged 14 to 23 weeks post-conception (WPC), and 5 penises from anencephalic fetuses, aged 18 to 22 WPC. The organs were removed and processed by routine histological and immunolabeling techniques. Analysis of connective tissue (Cot), smooth muscle (SMC) and elastic fibers (EF) were performed in sections. Data were expressed as area density (Ad) using digital processing and software. Means were statistically compared using the unpaired t test and linear regression was performed. Statistical significance was considered if $p < 0.05$. **Results:** The Intracavernosal septum was present in all samples. We did not observe differences in the Ad of Cot and SMC in the penises of anencephalic fetuses when compared to normal ones. The simple linear regression suggested that during human development there is a gradual increase in Cot ($R^2 = +0.45$) and a decrease of SMC ($R^2 = -0.62$) in the corpora cavernosa in both groups studied. Elastin was observed only in fetuses from 20th WPC. **Conclusions:** There was no difference in the structure of the corpora cavernosa and corpus spongiosum of anencephalic fetuses compared to normal ones. Elastin was documented from 20th WPC, which suggests the maintenance of erectile function. Histochemistry and immunolabeling suggested that penile shaft development is maintained and unaltered in anencephalic fetuses. Further studies should be performed to analyze anencephalic fetuses as a potential tissue donating group and a model for biological studies.

Keywords: Penis, erectile tissue, anencephaly, embryology, human fetuses

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Desenvolvimento embrionário da genitália externa.....	14
Figura 2-Fotomicrografia de uma genitália externa masculina	16
Figura 3- Desenho esquemático de uma pelve masculina	17
Figura 4- Desenho esquemático da vascularização peniana	18
Figura 5- Medida calcâneo- hálux	24
Figura 6- Bloco urogenital dissecado	25
Figura 7- Quantificação digital com grade de 100 pontos	27
Figura 8- Corte transversal do pênis de feto anencéfalo	33
Figura 9- Imunomarcacão para alfa actina corpo cavernoso.....	37
Figura 10- Imunomarcacão para alfa actina corpo esponjoso	38
Figura 11- Fotomicrografia corte transversal de corpo esponjoso	40
Figura 12- Fotomicrografia Resorcina Fuchsina de Weigert	41
Figura 13- Imunomarcacão para elastina corpo cavernoso.....	42
Figura 14- Imunomarcacão para elastina corpo esponjoso.....	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Média e Desvio Padrão do Peso dos Grupos.....	31
Gráfico 2- Média e Desvio Padrão da Idade Gestacional dos Grupos.....	32
Gráfico 3- Quantificação da Musculatura Lisa dos Corpos Cavernosos	34
Gráfico 4- Quantificação da Musculatura Lisa dos Corpos Esponjosos.....	35
Gráfico 5- Quantificação do Tecido Colágeno dos Corpos Cavernosos.....	35
Gráfico 6- Quantificação do Tecido Colágeno dos Corpos Esponjosos.....	36
Gráfico 7- Regressão Linear Simples- Densidade de Área Tecido Colágeno Vs Idade Gestacional	45
Gráfico 8- Regressão Linear Simples- Densidade de Área da Musculatura Lisa (Corpo Cavernoso) Vs Idade Gestacional.....	46
Gráfico 9- Regressão Linear Simples- Densidade de Área do Tecido Colágeno do Corpo Esponjoso Vs Idade Gestacional	47
Gráfico 10- Regressão Linear Simples- Densidade de Área da Musculatura Lisa do Corpo Esponjoso Vs Idade Gestacional	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Idade gestacional e parâmetros analisados na macroscopia dos fetos da amostragem.....	30
Tabela2- Quantificação dos Elementos nos diferentes segmentos analisados.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm- micrômetro

CAAE- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CC- Corpo Cavernoso

CE- Corpo Esponjoso

cm- centímetros

Col- Colágeno

CVC- Comprimento Vértice Cóccix

Da- Densidade de Área

DP- Desvio Padrão

DTN- Defeitos do Tubo Neural

ed- Edição

Ed- Editora

g- gramas

ML- Musculatura Lisa

SPC- Semanas Pós Concepção

Vs- Versus

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
1- EMBRIOLOGIA DA GENITÁLIA MASCULINA.....	13
2- A ANENCEFALIA.....	19
3- A CRESCENTE NECESSIDADE DO TRANSPLANTE TECIDUAL E DE ÓRGÃOS SÓLIDOS.....	21
4- OBJETIVOS.....	23
5- MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1- Métodos Histo e Imunohistoquímicos.....	26
5.2- Quantificações Digitais e Análises Estatísticas.....	27
6-RESULTADOS.....	29
7-DISCUSSÃO.....	49
8- CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
 ANEXO I Carta de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto	 64
ANEXO II Termo de cooperação com o Instituto Fernandes Figueira UERJ.....	65
APÊNDICE A- Artigo Aceito para Publicação no Journal of Sexual Medicine (Anencephaly does not cause structural alterations in the fetal penis).....	66
APÊNDICE B Artigo publicado durante a realização da Disciplina Participação Didática na Graduação (Anatomic Aspects of Inguinal Lymph Nodes Applied to Lymphadenectomy in Penile Cancer).....	67

INTRODUÇÃO

Com o avanço da faixa etária populacional mundial e, paradoxalmente, o aumento exponencial da morbi mortalidade por causas externas, há uma crescente necessidade da utilização do transplante tecidual e de órgãos nos indivíduos acometidos (Rizvi et al, 2011).

O uso de tecidos autólogos é sempre preferencial quando comparado à utilização dos de origem animal ou sintética (Fletcher et al, 1986). A crescente demanda da transplantação tanto tecidual quanto de órgãos não se acompanha da disponibilidade destes.

Muitos esforços têm sido feitos em busca da substituição tecidual com resultados preliminares satisfatórios utilizando-se tecidos sintéticos e matrizes cadavéricas. Neste escopo, apesar de controversa, a utilização de tecidos de fetos vem encontrando espaço na pesquisa de engenharia tecidual (Kalayciog˘lu et al, 2010), com a sua ampla aplicabilidade nos mais diversos campos.

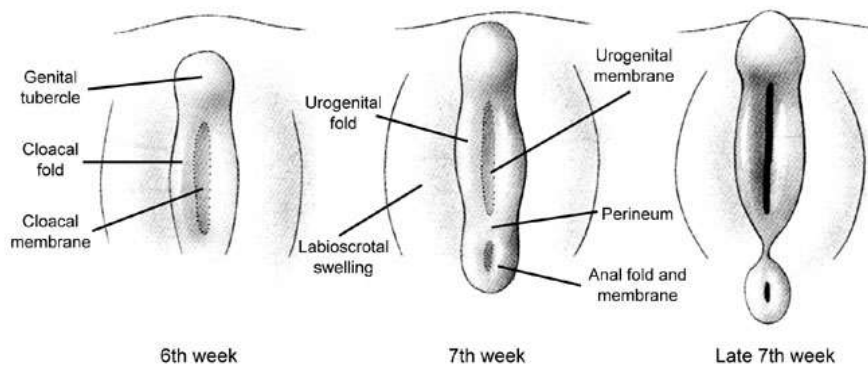
A partir da análise histológica do tecido de fetos normais e anencéfalos, poderemos avaliar futuros métodos de substituição tecidual, em específico da genitália, com o objetivo de avaliar estes fetos como possíveis modelos de estudo ou como doadores teciduais.

1- EMBRIOLOGIA DA GENITÁLIA MASCULINA

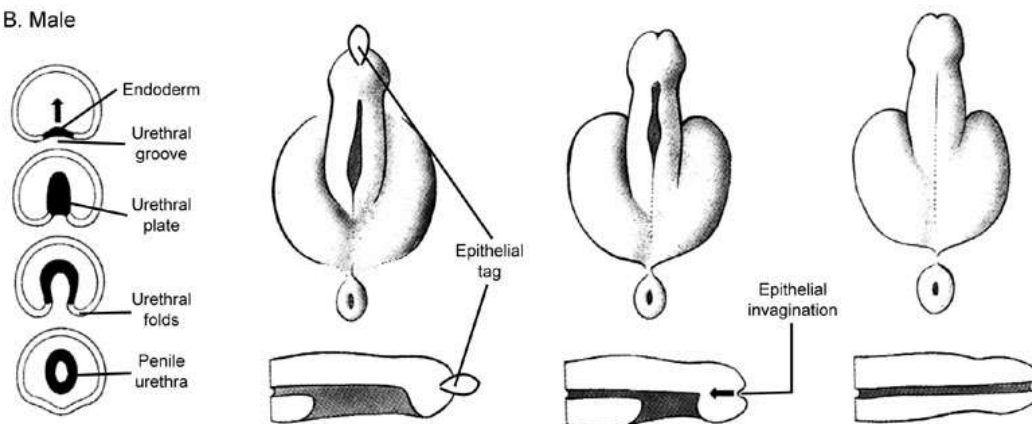
Nas fases mais precoces do desenvolvimento a genitália externa é semelhante para ambos os sexos. A partir da 5ª semana de gestação os folhetos ou pregas cloacais protuberam-se em cada lado da membrana cloacal. Essas pregas fundem-se anteriormente à membrana cloacal em seu 1/3 médio, formando o tubérculo genital.

Durante a divisão cloacal em seio urogenital e canal anal posterior, a porção do folheto cloacal lateral a abertura do seio urogenital forma a prega urogenital e a porção medial ao canal anorretal formará o folheto anal. Um novo par de membranas, chamado folhetos lábio escrotais, surgem então para flanquear cada lado da prega urogenital (Schoenwolf et al, 2009), (Figura 1).

A. Indifferent stage



B. Male



C. Female

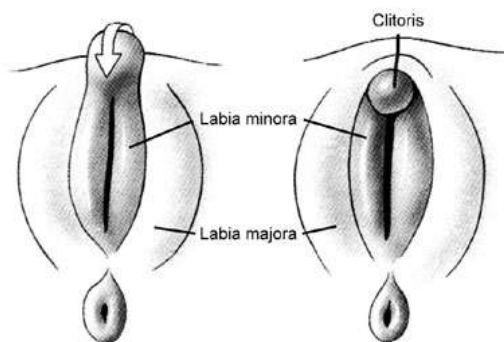


Figura 1 Desenvolvimento da genitália externa em fetos masculinos e femininos; **A**-A genitália externa desenvolve-se a partir de um par de pregas labio escrotales, um par de folhetos urogenitais e um tubérculo genital anterior. Inicialmente a genitália masculina e feminina são morfológicamente indistinguíveis até a 7ª semana de gestação. **B**, No sexo masculino, os seios urogenitais fundem-se e o tubérculo urogenital alonga-se para formar a haste peniana e a glândula. A uretra glandar é formada pela invaginação da superfície epitelial glandar. Os folhetos lábio escrotales fundidos darão origem ao escroto nos fetos masculinos. **C**, No sexo feminino, o tubérculo genital direciona-se inferiormente para formar o clitóris e os septos urogenitais mantêm-se separados para formar os pequenos lábios. Os folhetos lábios escrotales não fundidos formarão os grandes lábios. (Schoenwolf et al. modificado de Larsen's Human Embryology. Philadelphia, Churchill, Elsevier, 2009)

Baseado na teoria de Glenister de 1954, a cavidade do seio urogenital estende-se até a superfície da prega urogenital, formando uma membrana endodérmica linear, em torno da 6ª semana de gestação. Esta membrana é preenchida temporariamente por uma estrutura endodérmica chamada placa uretral, que se desintegra temporariamente para então se tornar mais aderida às estruturas da futura genitália. Em embriões masculinos esta membrana é mais alongada e ampla, enquanto que embriões femininos possuem uma estrutura mais curta e de comportamento mais angulado. Em comum para ambos os embriões é a presença de um broto ectodérmico no fim da placa uretral.

O tubérculo genital alonga-se para formar o falo e um primórdio das glândulas clitoriana e peniana é demarcado pela haste fálica através de um sulco coronal. A aparência da genitália externa é semelhante para embriões de ambos os sexos até a 7ª semana de gestação

No 4º mês de gestação, os efeitos da diidrotestosterona nos embriões masculinos tornam-se mais evidentes, manifestando-se por um aumento da separação do seio urogenital do canal anorretal. As pregas labioescrotais fundem-se medialmente para formar o escroto, e as pregas uretrais fundem-se para dar origem à uretra peniana, que se encontra completamente formada na 14ª semana pós-concepção. A uretra distal peniana é formada por uma combinação da fusão das placas uretrais e da interiorização das células ectodérmicas localizadas no segmento distal da glândula peniana. No adulto esta distinção embriológica manifesta-se pela diferença dos epitélios encontrados na uretra peniana em seu 1/3 médio e posterior como sendo um padrão do pseudo estratificado, enquanto que na uretra glândula manifesta-se por um epitélio escamoso de revestimento. Especula-se assim que é necessário um intenso mecanismo de interatividade entre o mesênquima uretral, hormônios e neurotransmissores, mediados pela ação diidrotestosterona (Moore et al, 2011).

Na ausência de diidrotestosterona o períneo primitivo não se alonga e as pregas labio escrotais não se fundem na linha média. O falo desloca-se inferiormente formando o clitóris e o seio urogenital definitivo torna-se o vestíbulo vaginal. As pregas uretrais irão formar os pequenos lábios e os folhetos labio escrotais formarão os grandes lábios.

Desenvolvimento fenotípico semelhante pode suceder-se em embriões com genótipos masculinos em que ocorra a ausência da enzima cinco alfa redutase ou naqueles com alterações do metabolismo da testosterona e dihidrotestosterona. Também se sabe atualmente do papel determinante do gene HOX4 para a diferenciação fenotípica do sistema urogenital em masculino onde, na sua ausência, podem ocorrer estágios de intersexo (Ravasi et al, 2010).

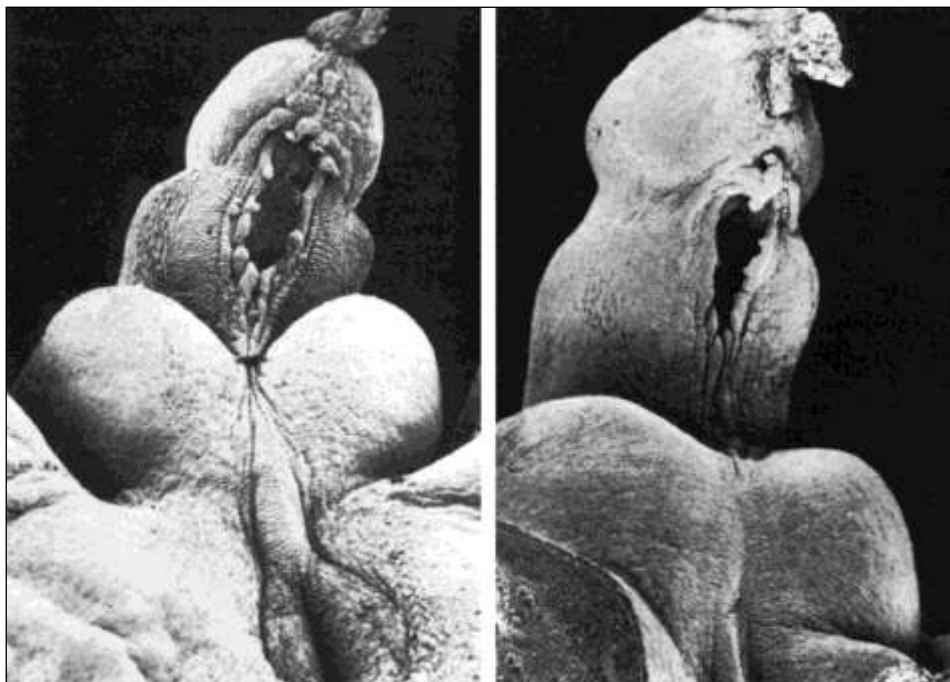


Figura 2 Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão, documentando o fechamento das pregas uretrais em feto masculino de aproximadamente 10 semanas de gestação. (Meller SE, e Waterman RE, in Atlas de Reprodução Humana. Hinghan MA, Kluwer Boston, 1982)

O desenvolvimento uretral acompanha-se em paralelo com o da haste peniana, anatomicamente a uretra é dividida em dois segmentos principais, o anterior e o posterior. O anterior apresenta um comprimento de aproximadamente 15 cm e estende-se do meato uretral até a uretra bulbar. A uretra posterior é formada pelos segmentos membranoso e prostático. Possui íntima relação com praticamente todos os órgãos do aparelho genital masculino compartilhando finalidades reprodutivas e de excreção urinária (Figura 3).

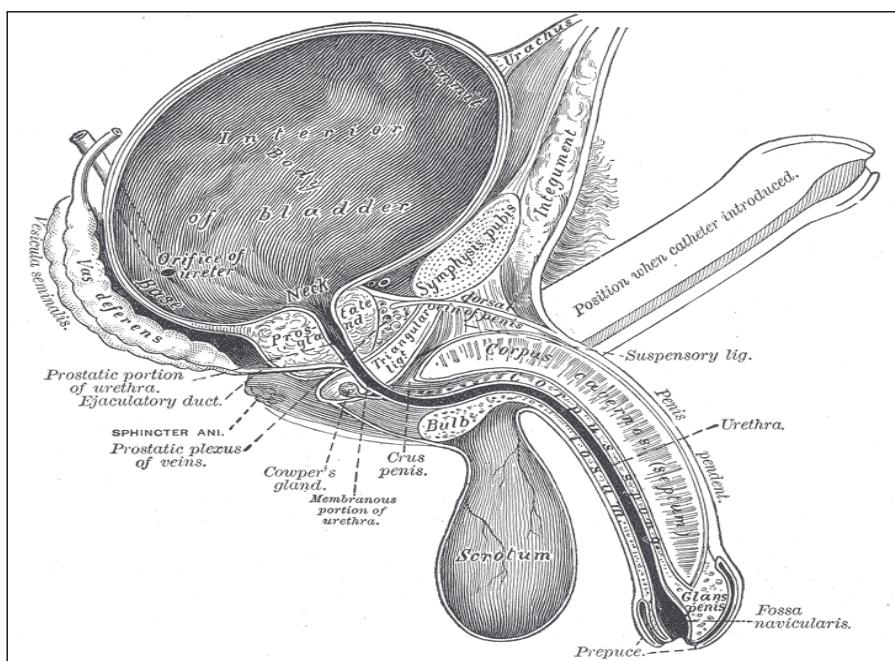


Figura 3 Corte sagital da pelve masculina com relação topográfica da uretra e seus segmentos. Gray's Anatomy 29a Ed, 1977. Ed Guanabara Koogan.

A sua vascularização é compartilhada com a do corpo cavernoso e do pênis. A artéria pudenda interna bifurca-se em dois ramos: a artéria bulbo-uretral e a dorsal peniana. A artéria bulbo-uretral é responsável pela maior parte do segmento proximal da uretra até o seu terço médio, já no segmento peniano com os ramos bulbares e esponjosos. O segmento mais anterior da uretra é vascularizado principalmente pelo ramo cavernoso da artéria dorsal peniana (figura 4).

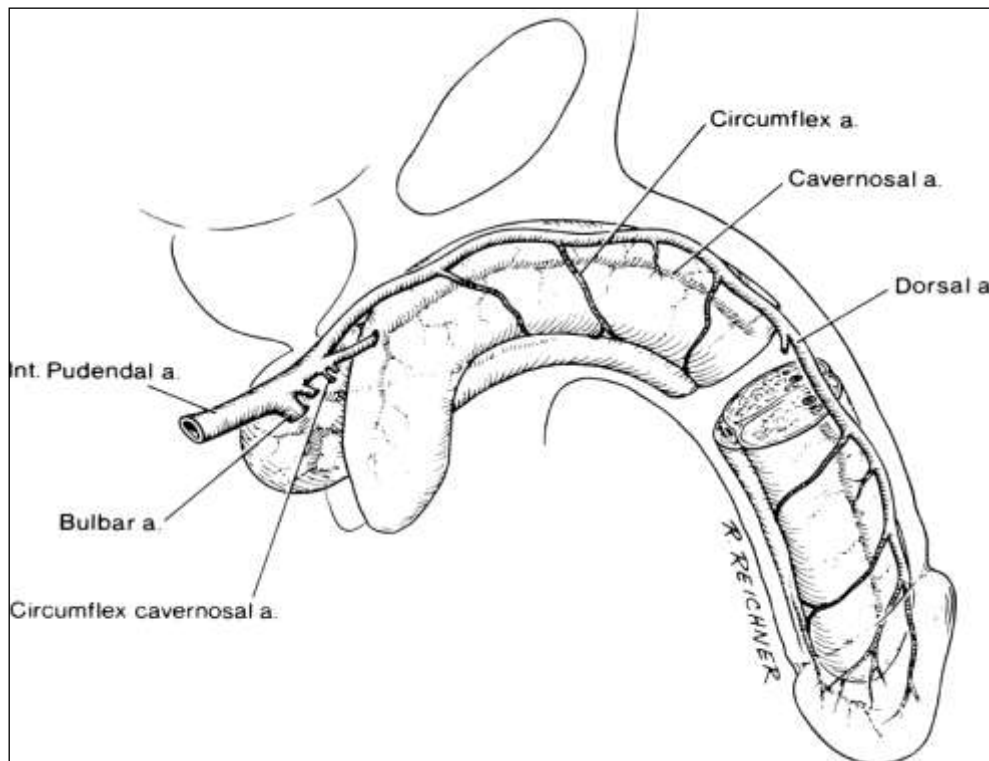


Figura 4 Desenho esquemático da vascularização peniana e da uretra. James D Brooks, in Campbell's Urology 8ª ed.

O segmento mais posterior da uretra masculina guarda relação no seu desenvolvimento embriológico com o do trígono vesical e a uretra prostática. O segmento anterior da uretra tem seu desenvolvimento intimamente relacionado com o do falo. Como o meato uretral não possui tecido de origem embriológica específica, o desenvolvimento da uretra pendular em seu estágio inicial pode possuir dois primórdios uretrais sendo denominadas placas uretrais que se encontram em fundo cego (Kusrock et al, 1999).

2- A ANENCEFALIA

Más formações congênitas são a principal causa de óbito em recém natos em países desenvolvidos. Os Defeitos do Tubo Neural (DTN) são o segundo grupo de alteração mais comum, perdendo apenas para as más formações cardíacas. Os DTN são representados pela mielomeningocele e anencefalia. A sua incidência descrita está em um para mil nascidos vivos; porém pode oscilar de 0,9 como no Canadá ou até 7,7 nos Emirados Árabes Unidos por mil nascidos vivos (Tolmie et al, 1996). O índice de recorrência pode chegar a 10% em casais com gestações prévias que apresentaram defeitos do tubo neural (Lemire et al, 1978).

A anencefalia, macroscopicamente, se caracteriza pela ausência da quase totalidade da calota craniana, meninges e couro cabeludo, resultantes da falência do fechamento do tubo neural. Os hemisférios cerebrais e o cerebelo estão ausentes e apenas um tronco cerebral residual é identificado. A glândula pituitária é geralmente hipoplásica e, apesar do feto contar com uma medula espinhal, os tratos córtico piramidais estão ausentes tendo em vista da inexistência do córtex cerebral (Coop et al, 1990).

É uma patologia invariavelmente letal e a sobrevida do recém nato varia de horas a semanas, quando oferecido suporte adequado. Está associada à implantação baixa do pavilhão auricular, fenda palatina e defeitos cardíacos congênitos em até 20%. Estima-se que alterações genéticas e indivíduos susceptíveis aos efeitos da baixa nutrição (destacando-se a vitamina B 12) são os fatores de risco para o desenvolvimento desta patologia. Cerca de 50% das gestações de anencéfalos acompanham-se de ploidramnia. Confirma-se o diagnóstico com a realização da amniocentese com dosagem da alfa feto proteína e ultrassonografia obstétrica em 03 dimensões entre as 14^a e 16^a semanas de gestação, (Haddow et al, 1994).

Neurulação é a nomenclatura utilizada para a formação do tubo neural e é um dos principais eventos na morfogênese humana. O tubo neural dá origem ao sistema nervoso central como o córtex cerebral, tronco cerebral e medula espinhal. A neurulação em embriões de mamíferos ocorre em duas fases: Neurulação Primária e Neurulação Secundária (Purves e Lichtman, 1985).

A neurulação primária desenvolve todo o tubo neural rostral e o neurosporo caudal. Durante este processo, que ocorre entre as 3ª e 4ª semanas de gestação, a camada plana de células que envolvem a notocorda torna-se um cilindro, por onde o sistema nervoso se desenvolverá. Este desenvolvimento acontece em um sentido crânio caudal, sendo responsável pela formação do sistema nervoso central, tronco cerebral e medula espinal. A neurulação secundária se dá a partir da extremidade caudal, ou neurosporo caudal. É mediada por células-tronco e encontra-se ausente em mamíferos sem cauda, não é responsável até o presente momento, por alterações do desenvolvimento caudal como a mielomeningocele (O’Rahilly e Muller, 2002).

Os DTN em humanos são o resultado de efeitos combinados de alterações genéticas e influências do meio sendo um exemplo clássico de uma patologia multifatorial. Com a identificação dos fatores genéticos será possível caracterizar as interações entre genes e a exposição ao meio, conferindo bases para o desenvolvimento de técnicas de prevenção e aconselhamento genético aos casais. Estipula-se que o fenômeno de neurulação possa estar determinantemente envolvido nesta patologia (Lobach et al, 1993).

3- A CRESCENTE NECESSIDADE DO TRANSPLANTE TECIDUAL E DE ÓRGÃOS SÓLIDOS

Estima-se que nos Estados Unidos da América, um em cada 1000 nascimentos seja de um feto anencéfalo (Blatter et al, 2004). No Brasil, não há estatística publicada para este ocorrido, no entanto fontes do Ministério Público Federal apontam o país como sendo o quinto mais prevalente do mundo nesta má formação. É uma premissa legal dos órgãos do governo tomar as decisões sobre o abortamento após análise individual da gestação. Desta maneira os dados sobre abortamentos de anencéfalos pertencem mais à esfera jurídica do que uma estatística do próprio Ministério da Saúde (Fonteles, 2006).

Sabe-se que a legislação brasileira quando referente à utilização de produtos de abortamentos encontra-se atrasada em virtude de uma forte pressão de seguimentos católicos e pentecostais, dentre outras organizações sociais que, através de movimentos democráticos, impedem a regularização deste ato.

Nas últimas décadas o transplante de órgãos tem oferecido esperança para pacientes sofrendo de doenças crônico-degenerativas, oncológicas e patologias traumáticas. No entanto, a sua aplicabilidade na população pediátrica se encontra restrita, tendo em vista a limitação anatômica ou a própria falta de órgãos de uma fonte doadora, tanto intervivos quanto cadavéricos. Apesar do critério estabelecido para a morte encefálica para doadores intervivos adultos, a população pediátrica, em especial os recém natos, raramente preenche este item (Shewmonet et al, 1989).

Decorrente da restrição de doadores pediátricos adequados, o uso de fontes diferentes de tecidos como sintéticos derivados de animais e doadores intervivos pediátricos, tem sido utilizados. Porém, ainda assim, há uma importante restrição na disponibilidade destes tecidos (Caplan 1987, 1988; e Byrne, 1995).

A utilização de órgãos de anencéfalos pode oferecer algum conforto aos pais destes recém natos, uma vez que a utilização do tecido destes poderia ajudar uma população específica conferindo uma sobrevida a uma criança invariavelmente doente que, em última análise, seria um adulto produtivo (Fost 1989, Rothenberg, 1990). No entanto, fetos anencéfalos não preenchem os critérios existentes para

morte encefálica restando à utilização destes tecidos, ser uma decisão exclusiva dos familiares e das partes envolvidas (Milliez, 2008).

Atualmente, no Brasil, tramita no congresso nacional um projeto de lei regulamentando o aborto e, conseqüentemente, a utilização dos tecidos de fetos anencéfalos ainda com parecer final a ser proferido pelo Supremo Tribunal Federal. Produtos de fetos anencéfalos somente podem ser utilizados após a assinatura de um termo de consentimento dos pais e terem sido provenientes de um abortamento legal ou óbito neonatal (Pinotti, 2004).

Apesar dos conflitos éticos, a literatura mostra vários trabalhos com a utilização de órgãos transplantados de fetos anencéfalos (Labarge et al, 1987; Salamanet al 1989; Byrne 1995; Milliez 2008). A estrutura dos órgãos de anencéfalos é praticamente desconhecida onde, recentemente, pesquisas com a análise da morfologia da bexiga (Pazos et al, 2011) e dos rins (Kalayciog˘lu et al, 2010) foram publicadas.

O uso da engenharia tecidual em pênis de fetos anencéfalos seria potencialmente útil nos países em desenvolvimento, onde a incidência do câncer de pênis e sua necessidade de tratamento encontram-se em uma crescente (Koifman et al, 2011). Da mesma maneira em situações onde ocorre traumatismo pélvico com perda de parte ou da totalidade a genitália (Badawy et al, 2010) haveria o benefício do transplante tecidual.

O tecido do corpo cavernoso de pênis de adultos tem sido utilizado como modelo de estudo para novas drogas farmacológicas para o tratamento da disfunção erétil (Regadas et al, 2010). O uso da genitália de fetos anencéfalos abre uma nova possibilidade para o estudo da anatomia e da histologia de um grupo em particular, que ainda não sofreu influência do meio externo.

Adicionando dados para futuros experimentos e modelos de fisiopatologia em doenças penianas, as informações provenientes do estudo da matriz extra celular podem ser úteis para a expansão de técnicas de reconstrução cirúrgica, especialmente com tecidos autólogos

4- OBJETIVOS

A morfologia do pênis de fetos anencéfalos é desconhecida. O objetivo do presente estudo é comparar a estrutura e morfologia do corpo cavernoso e corpo esponjoso de fetos anencéfalos e normais com a finalidade de propor um novo modelo para estudos biológicos e de transplante tecidual.

5- MATERIAL E MÉTODOS.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Anexo1), com o registro CAAE: 0048.0.228.328-10 em conformidade com o termo de cooperação entre a Fundação Osvaldo Cruz, o Instituto Fernandes Figueira e a Unidade de Pesquisa Urogenital (Anexo 2).

Os fetos provenientes de doação foram alocados em um grupo do sexo masculino dentro do segundo trimestre de gestação. Posteriormente foram separados em grupos de fetos anencéfalos e de controle (normais), totalizando 05 espécimes do primeiro grupo e 11 do segundo.

A idade gestacional fetal foi calculada em Semanas Pós Concepção (SPC) utilizando-se o critério da distância do calcâneo ao hálux ou do calcâneo ao pododáctilo mais longo (Figura 5). Este critério é o mais utilizado para esta avaliação, encontrando vasta concordância na literatura (Hern, 1984; Mercer et al 1987; Platt et al 1988, Favorito et al, 2004).



Figura 5- Exemplo da utilização da medida calâneo-hálux com paquímetro de precisão.

Os fetos também foram avaliados quanto Comprimento Vértice-Cóccix (CVC) e o diâmetro da calota craniana em centímetros. Também foi realizada a pesagem dos espécimes onde todas as medidas foram realizadas por um único pesquisador.

Após as mensurações antropométricas os fetos foram dissecados com uma lupa de magnificação com lentes de 16/25X. O bloco urogenital foi então removido em uma única peça que incluía genitália com a bexiga, próstata, ureteres e os rins (Figura 6).



Figura 6- Bloco urogenital dissecado, com visualização do pênis em sua integridade, bexiga, próstata, útero, ureteres e rins.

O pênis foi separado do restante do bloco genital e incluído em formalina tamponada a 10%. Posteriormente o espécime era emblocado em parafina para ser encaminhado ao micrótomo para a realização de cortes com 5 μ m de espessura em intervalos de 200 μ m.

5.1- Métodos Histo e Imunohistoquímicos

O objetivo final dos métodos histo e imunohistoquímicos foi realizar a quantificação dos diferentes tecidos como musculatura lisa, tecido conjuntivo e fibras elásticas.

Inicialmente, a integridade tecidual foi avaliada com a coloração de Hematoxilina-Eosina em aumentos de 200 e 400 vezes. Com a confirmação desta integridade, os tecidos foram encaminhados à bancada para a realização dos demais métodos histológicos.

O Tricrômico de Masson foi utilizado para a análise e quantificação da musculatura lisa e do tecido colágeno (ou conectivo). Neste método a musculatura lisa manifesta-se por um tom avermelhado, enquanto que o espaço ocupado pelo tecido conectivo encontra-se em um tom azulado.

A Resorcina Fuccisa de Weigert com prévia oxidação pela oxona foi o método histoquímico utilizado para a verificação e quantificação das fibras elásticas. Este método é exclusivo para a quantificação de fibras elásticas onde este elemento fica marcado por uma cor marron escurecida e os demais em um tom amarelado.

Para a confirmação dos achados da quantificação da musculatura lisa, foi realizada uma contraprova com método imunohistoquímico específico para este, utilizando-se Anticorpo Monoclonal para Alfa Actina 08-0106 (Laboratórios Zymed, São Francisco, CA, Estados Unidos da América).

Para a confirmação dos achados da quantificação das fibras elásticas, foi realizada uma contraprova com método imunohistoquímico específico para estas utilizando-se Anticorpo Monoclonal para Elastina ab 9519 (Laboratórios Abcam, Cambridge, MA, Estados Unidos da América).

5.2- Quantificações Digitais e Análises Estatísticas

Utilizamos o método de quantificação digital padronizado no laboratório de pesquisa de nossa universidade (Mandarin-de-Lacerda et al, 2010). Através da digitalização da imagem produzida em um microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmera Olympus DP70.

Optamos pela quantificação de Densidade de Área (Da) dos diferentes componentes teciduais em uma grade de 100 pontos através dos Softwares Image Pro e Image J que são programas de acesso livre disponíveis na World Wide Web e oferecidos pelo National Institute of Mental Health (NIMH).

O elemento era quantificado sempre em um mesmo ponto de referência de uma grade de 100 pontos (Quadrante Superior Direito), o elemento tecidual que não preenchesse esse critério era excluído (Figura 7).

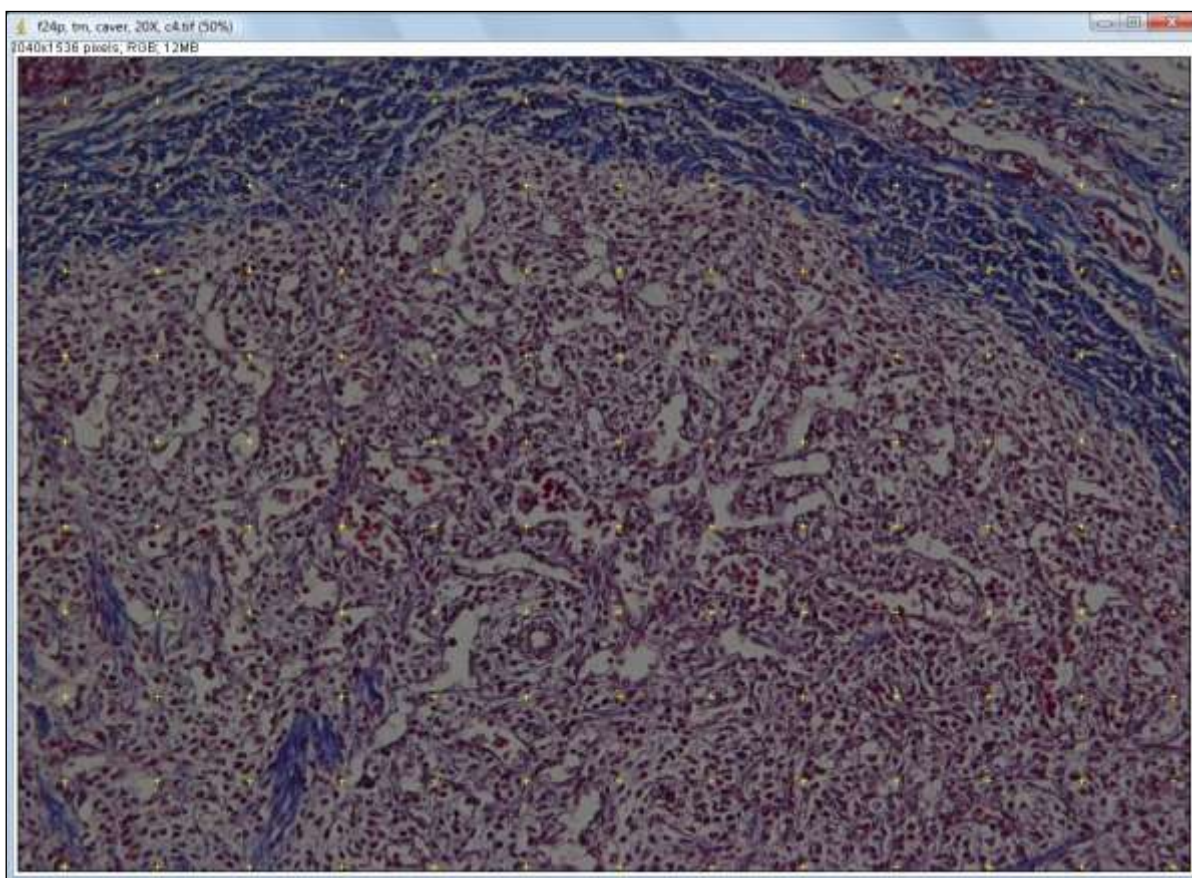


Figura 7- Exemplo de quantificação digital com grade de 100 pontos, com a utilização do programa Image J. Tricrômico de Masson com aumento de 200X, corpo cavernoso de feto de controle. Grade de quantificação com cruzes em amarelo.

Os fetos anencéfalos e de controle foram separados em grupos para comparação dos mais diferentes parâmetros morfológicos, histoquímicos e imunohistoquímicos.

Para a análise estatística para comparação das amostras foi realizado o Teste T não pareado, utilizando-se validade estatística se o valor $p < 0.05$. Posteriormente, utilizamos também uma análise de Regressão Linear Simples, quando correlacionada a densidade de área tecidual *versus* idade gestacional (SPC).

6- RESULTADOS

Durante a avaliação macroscópica das amostras, não foi observada ausência ou genitália supranumerária ou qualquer outra malformação que não fosse exclusivamente a anencefalia. Não foi registrada agenesia ureteral, ectopia renal ou outra malformação.

A idade gestacional dos fetos normais oscilou da 11^a a 20^a SPC e o peso de 110 a 435g (Média de 248,33 com DP de $\pm 104,86$) e possuíam um CVC de 13 a 26,5 cm. Os fetos anecéfalos possuíam uma idade gestacional de 19^a a 22^a SPC, um peso de 280 a 420g (média de 317,15g com DP $\pm 81,20$) e possuíam um CVC de 14 a 16,5 cm (tabela 1, gráficos 1 e 2).

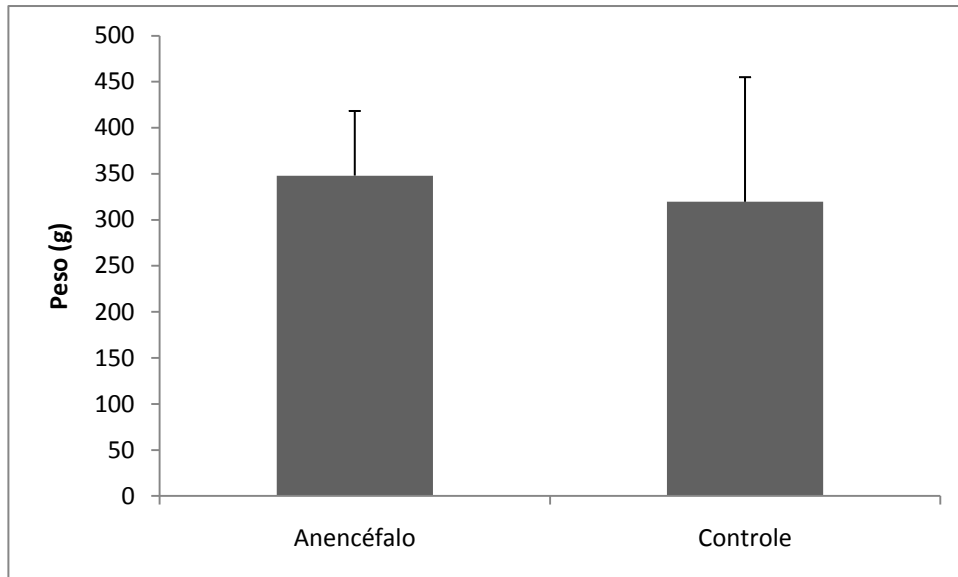
Tabela 1- Idade gestacional e parâmetros analisados na macroscopia dos fetos da amostragem.

Feto	Idade (SPC)	Anomalia	Peso (g)	CVC (cm)
1	19	Anencefalia	280	14
2	20	Anencefalia	280	14
3	20	Anencefalia	340	16,5
4	21	Anencefalia	420	15,5
5	22	Anencefalia	420	16,5
6	11	Ausente	245	14
7	12	Ausente	180	14,5
8	15	Ausente	110	13
9	16	Ausente	245	20,5
10	17	Ausente	300	17,5
11	17	Ausente	255	16,5
12	18	Ausente	380	18,5
13	18	Ausente	365	16
14	20	Ausente	400	18,5
15	20	Ausente	435	18
16	20	Ausente	600	26,5

Em ordem: o número dado ao espécime analisado; a idade do espécime em Semanas Pós Concepção (SPC); a anomalia apresentada; o peso em gramas (g); O Comprimento Vértice- Cóccix (CVC) em centímetros (cm).

Quando se comparando os resultados entre os pesos das amostras, não houve diferença significativamente estatística, (gráfico 1).

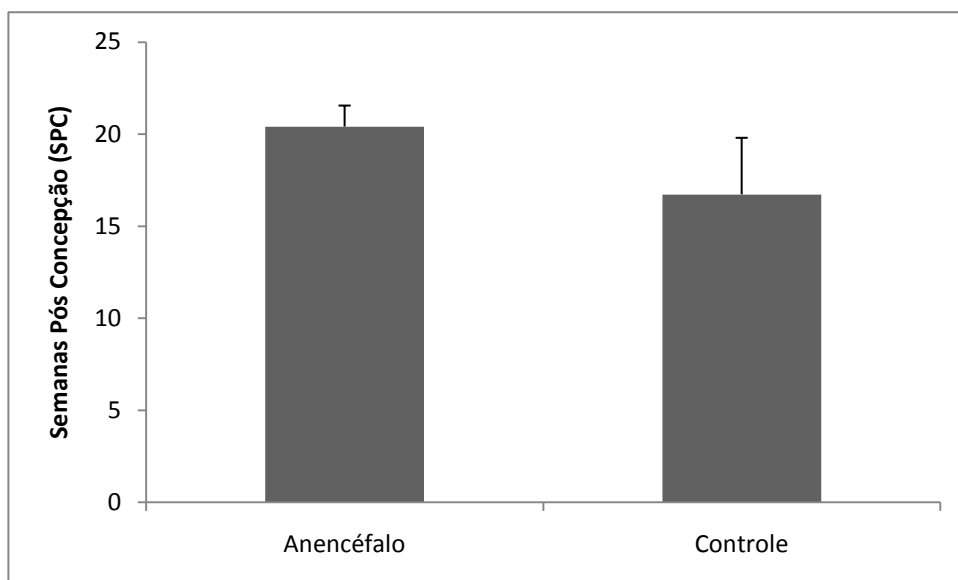
Gráfico 1- Média e Desvio Padrão do Peso dos Grupos.



Média e desvio padrão do peso (g) das diferentes amostras, fetos anencéfalos e de controle, $p=0,66$.

Comparando-se as idades gestacionais das diferentes amostras, houve diferença estatística, onde na amostragem de fetos anencéfalos prevaleceu uma idade mais avançada (gráfico 2).

Gráfico 2- Média e Desvio Padrão da Idade Gestacional dos Grupos.



Média e desvio padrão da idade gestacional (SPC) das diferentes amostras, fetos anencéfalos e de controle, $p=0,023$.

Na análise morfométrica à partir de cortes histológicos, foi verificada a integridade da anatomia dos fetos de controle e anencéfalos. As duas amostragens apresentaram idêntica distribuição de septos intercavernosos, artérias cavernosas, veias dorsais superiores e profundas. Ambos os grupos apresentavam prepúcio bem desenvolvido (Figura 8).

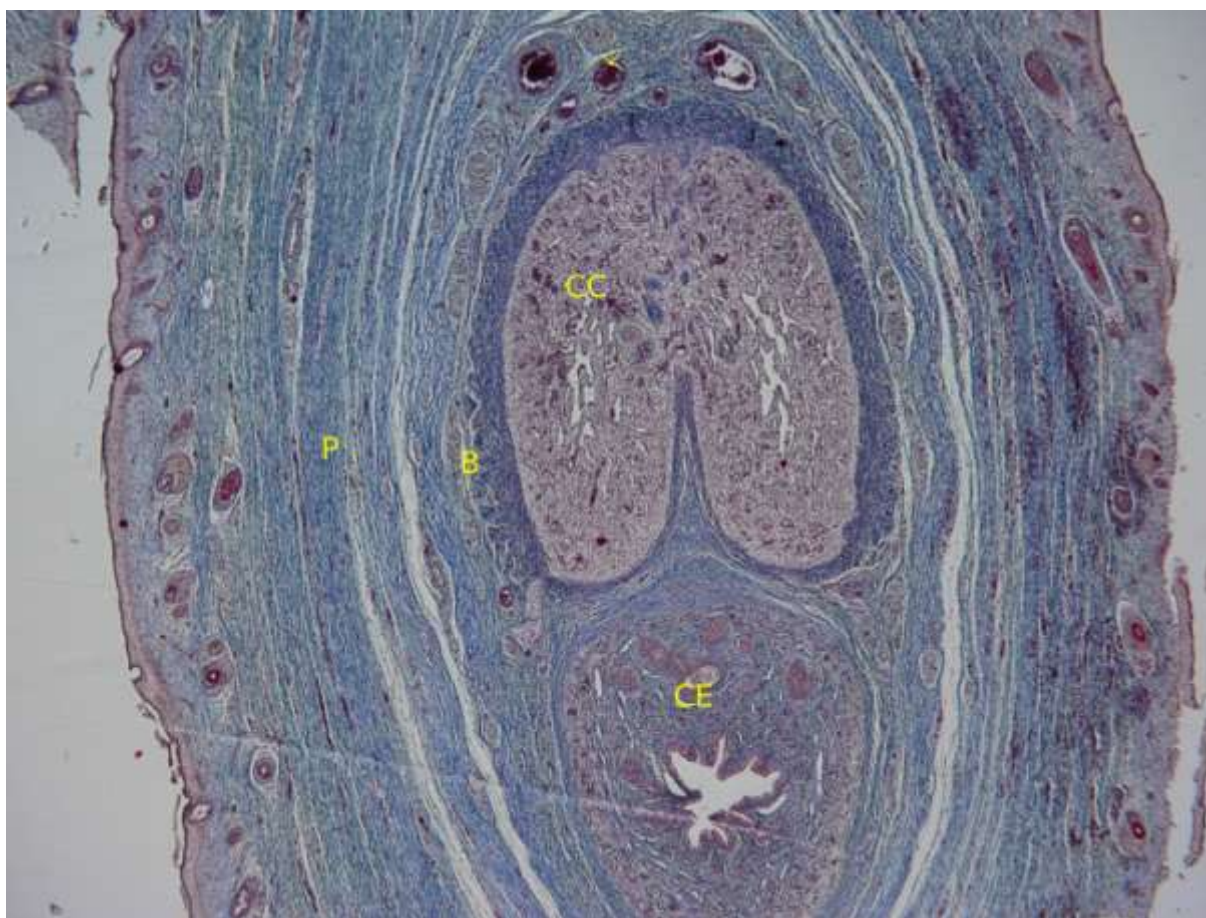


Figura 8- Fotomicrografia de tricrômico de Masson, objetiva de 4X. Corte transversal de pênis de feto anencéfalo, 20ª SPC. O prepúcio (P) encontra-se bem desenvolvido, a Fásia de Buck (B) é exuberante. Corpos Cavernosos (CC) e Corpo Esponjoso (CE) se encontram bem delimitados, assim como as estruturas vasculares (setas).

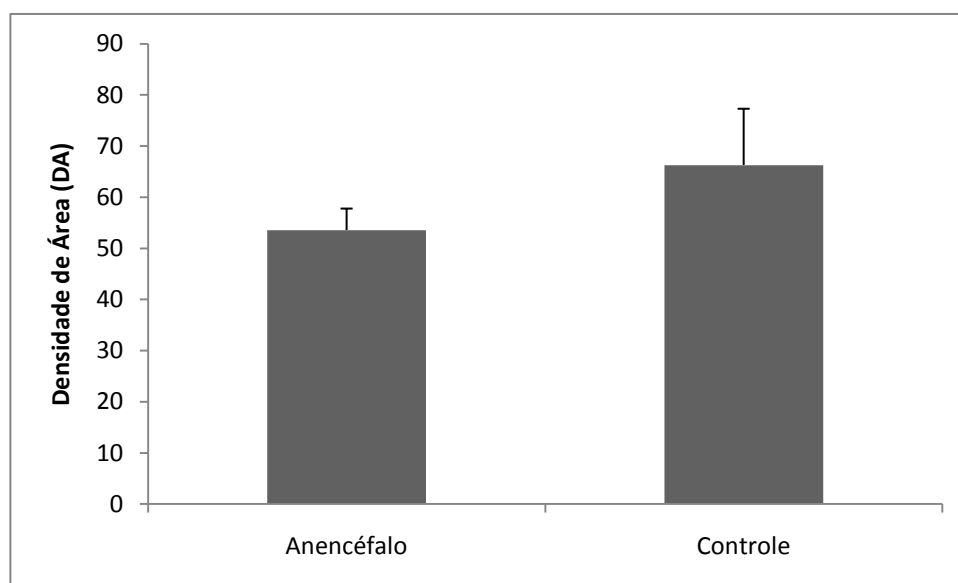
Para a comparação da quantificação, foram separados os resultados dos corpos cavernosos e esponjosos em seus diferentes elementos, tecido conjuntivo, colágeno e musculatura lisa. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos diferentes elementos dos seguimentos pesquisados, (Tabela2, gráficos 3, 4, 5 e 6).

Tabela 2- Quantificação dos Elementos nos diferentes segmentos analisados

Elemento/ Segmento	Média/Controles (DP)	Média/Anencéfalos (DP)	Valor de p
Col- CC	18,97 ($\pm 7,93$)	22,15 ($\pm 5,84$)	p=0,40
ML- CC	66,27 ($\pm 10,99$)	53,55 ($\pm 4,19$)	p=0,54
Col- CE	32,91($\pm 9,23$)	29,92 ($\pm 11,09$)	p=0,95
ML- CE	14,87 ($\pm 6,21$)	26,29 ($\pm 14,84$)	P=0,16

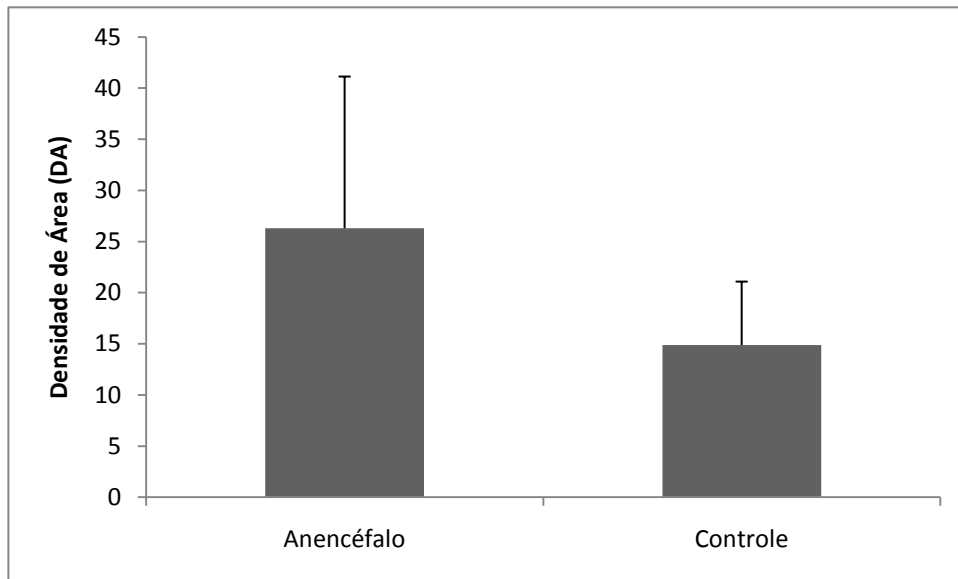
DP- Desvio Padrão; Col- Colágeno; CC- Corpo Cavernoso; ML- Musculatura Lisa; CE- Corpo Esponjoso.

Gráfico 3- Quantificação da Musculatura Lisa dos Corpos Cavernosos



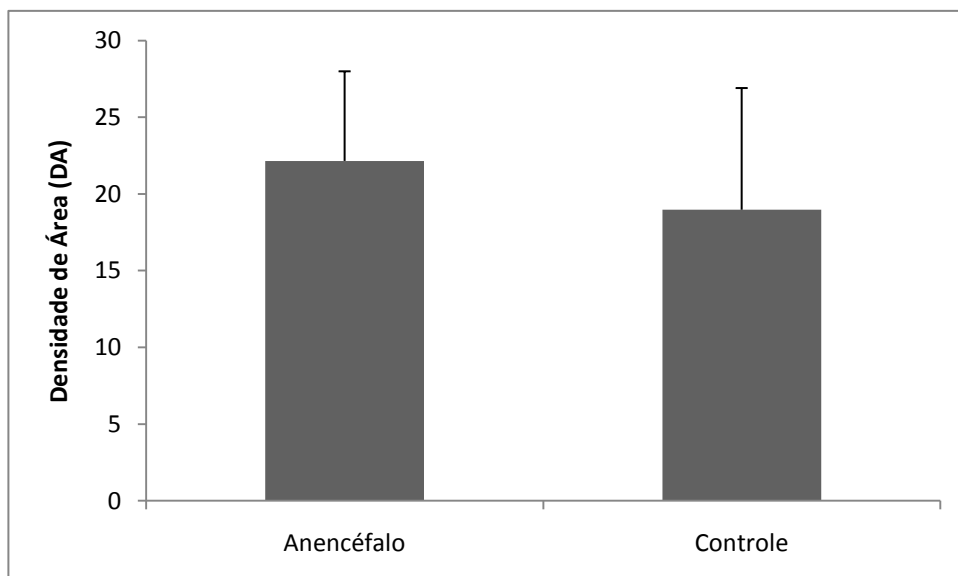
Média e Desvio Padrão da quantificação da musculatura lisa dos corpos cavernosos de anencéfalos e controles (p=0,54).

Gráfico 4- Quantificação da Musculatura Lisa dos Corpos Esponjosos



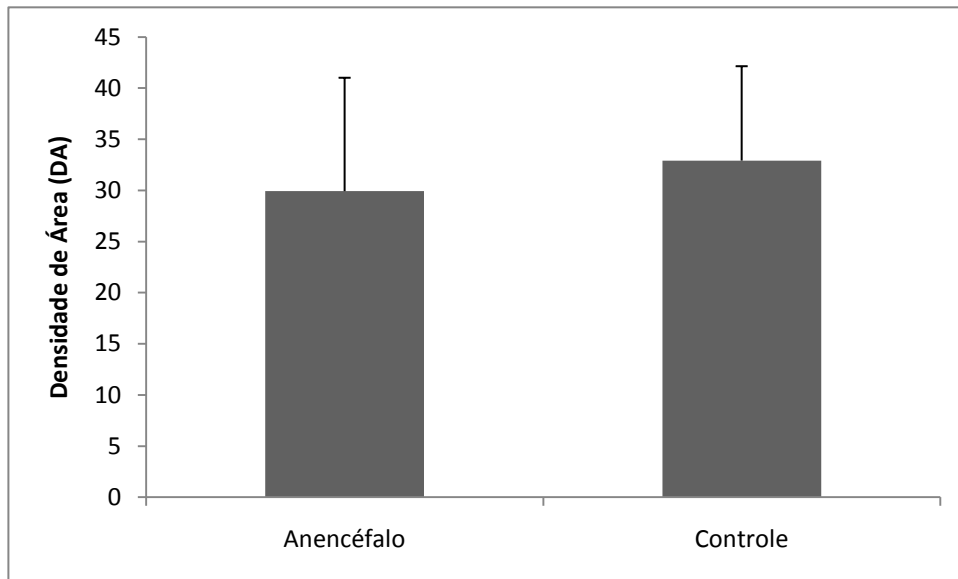
Média e Desvio Padrão da quantificação da musculatura lisa dos corpos esponjosos de anencéfalos e controles ($p=0,16$).

Gráfico 5- Quantificação do Tecido Colágeno dos Corpos Cavernosos



Média e Desvio Padrão da quantificação do tecido colágeno dos corpos cavernosos de anencéfalos e controles ($p=0,40$).

Gráfico 6- Quantificação do Tecido Colágeno dos Corpos Esponjosos



Média e Desvio Padrão da quantificação do tecido colágeno dos corpos esponjosos de anencéfalos e controles ($p=0,95$).

Para a confirmação dos dados quantitativos da musculatura lisa, tendo em vista a pouca literatura publicada referente a análise histoquímica para o tecido fetal, foi realizado um estudo imunohistoquímico para a alfa actina, que documentou distribuição deste elemento de maneira semelhante em fetos normais e anencéfalos de idade gestacional aproximada. Esta marcação foi positiva em corpos cavernosos e esponjosos de fetos normais e anencéfalos (figuras 9 e 10).

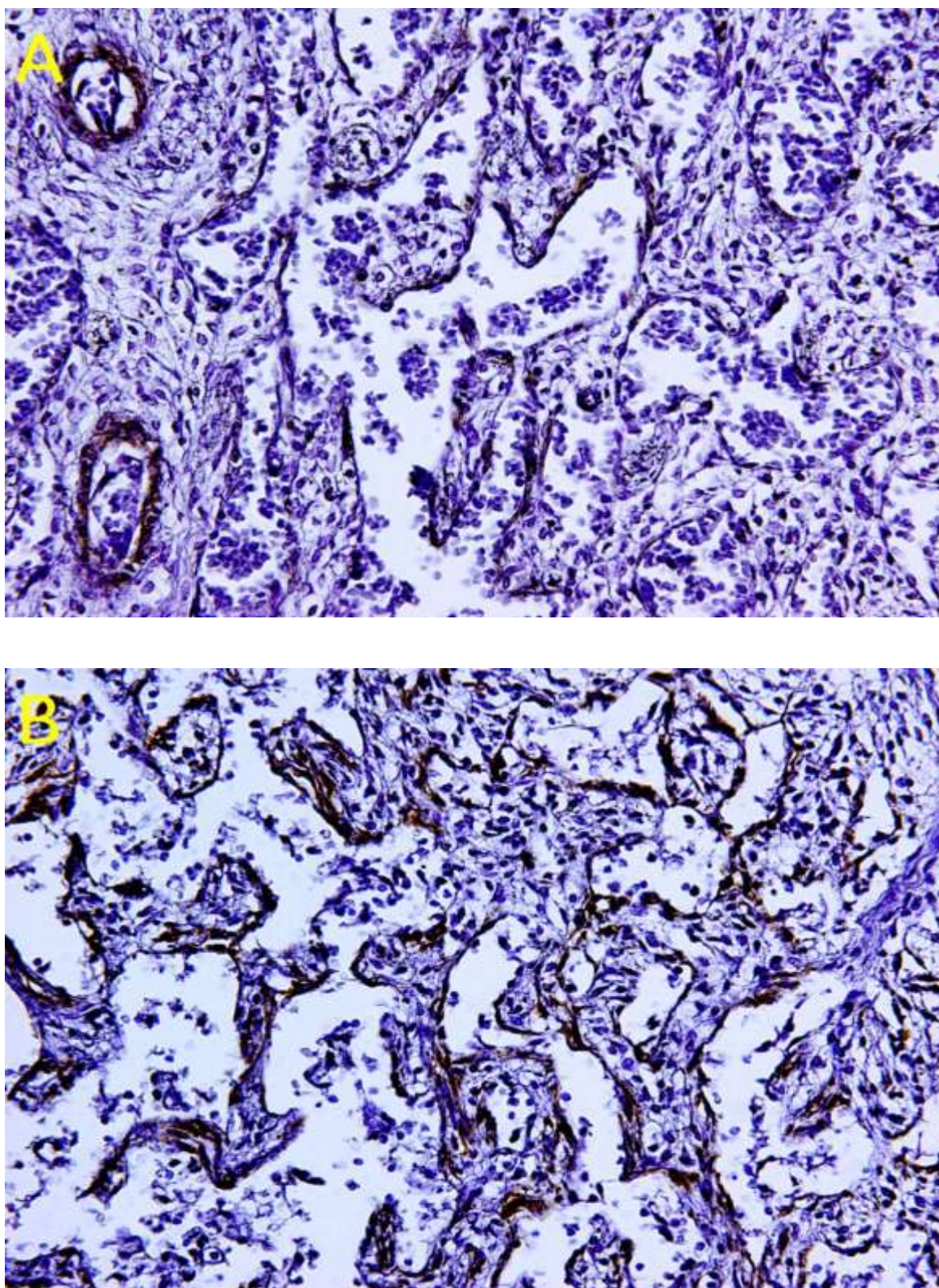


Figura 9- Fotomicrografia imunomarcção para alfa actina, objetiva de 40X. A-Corpo cavernoso de feto anencéfalo de 20ª SPC, B Feto controle de 22ª SPC. A imunomarcção se manifesta de cor amarronzada na superfície das trabéculas de maneira similar para ambas as amostras.

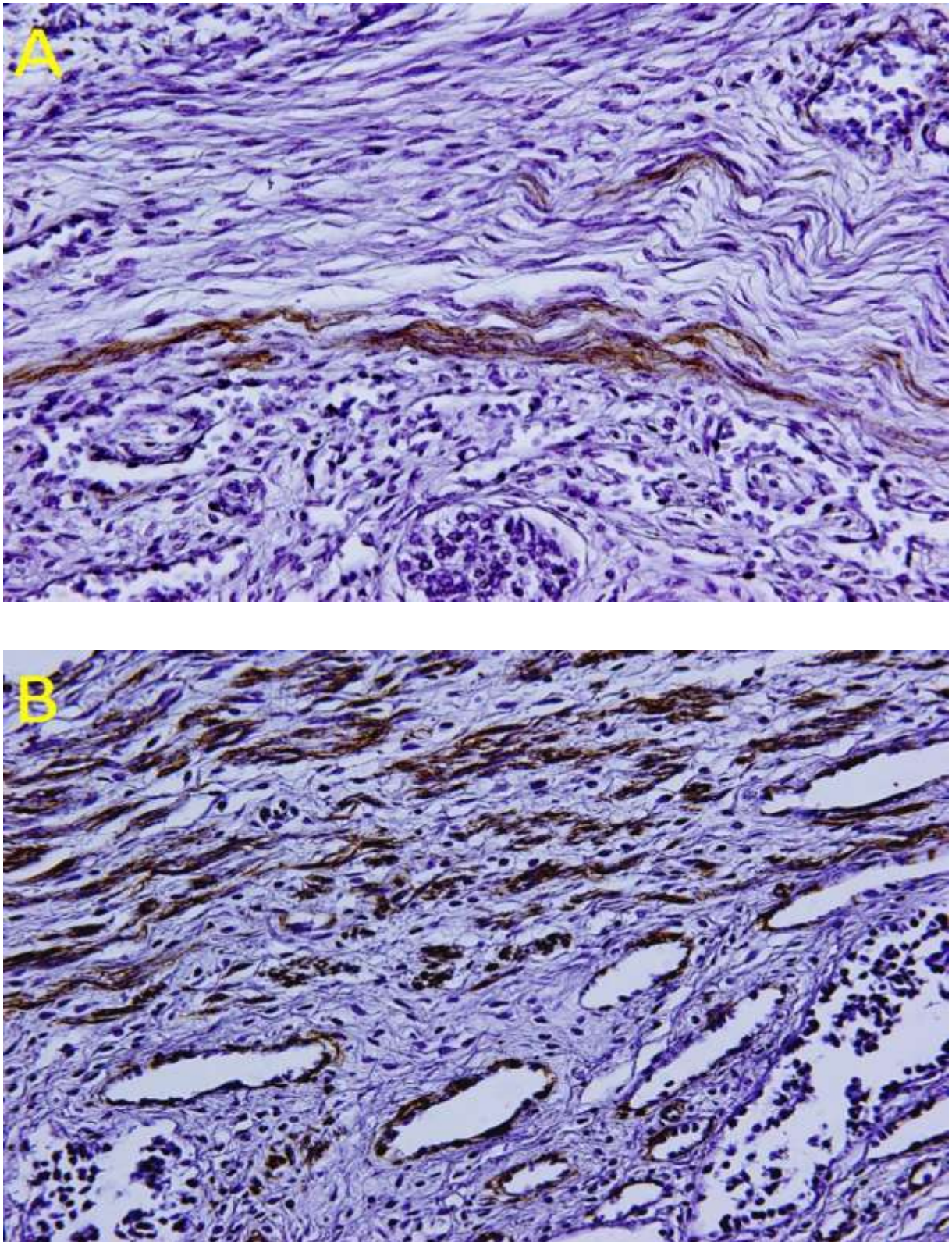


Figura 10- Fotomicrografia imunomarcção para alfa actina, objetiva de 40X. A-Corpo esponjoso de feto anencéfalo de 20 SPC, B Corpo esponjoso de feto controle de 22 SPC. A imunomarcção se manifesta de cor amarronzada no limite externo do corpo esponjoso de maneira similar para ambas as amostras.

A integridade epitelial das amostras analisadas estava confirmada pela avaliação do urotélio uretral. Não foram observadas diferenças histologicamente singificativas entre os segmentos uretrais de fetos normais e anencéfalos de idêntica idade gestacional em relação ao epitélio de transição (figura 11).

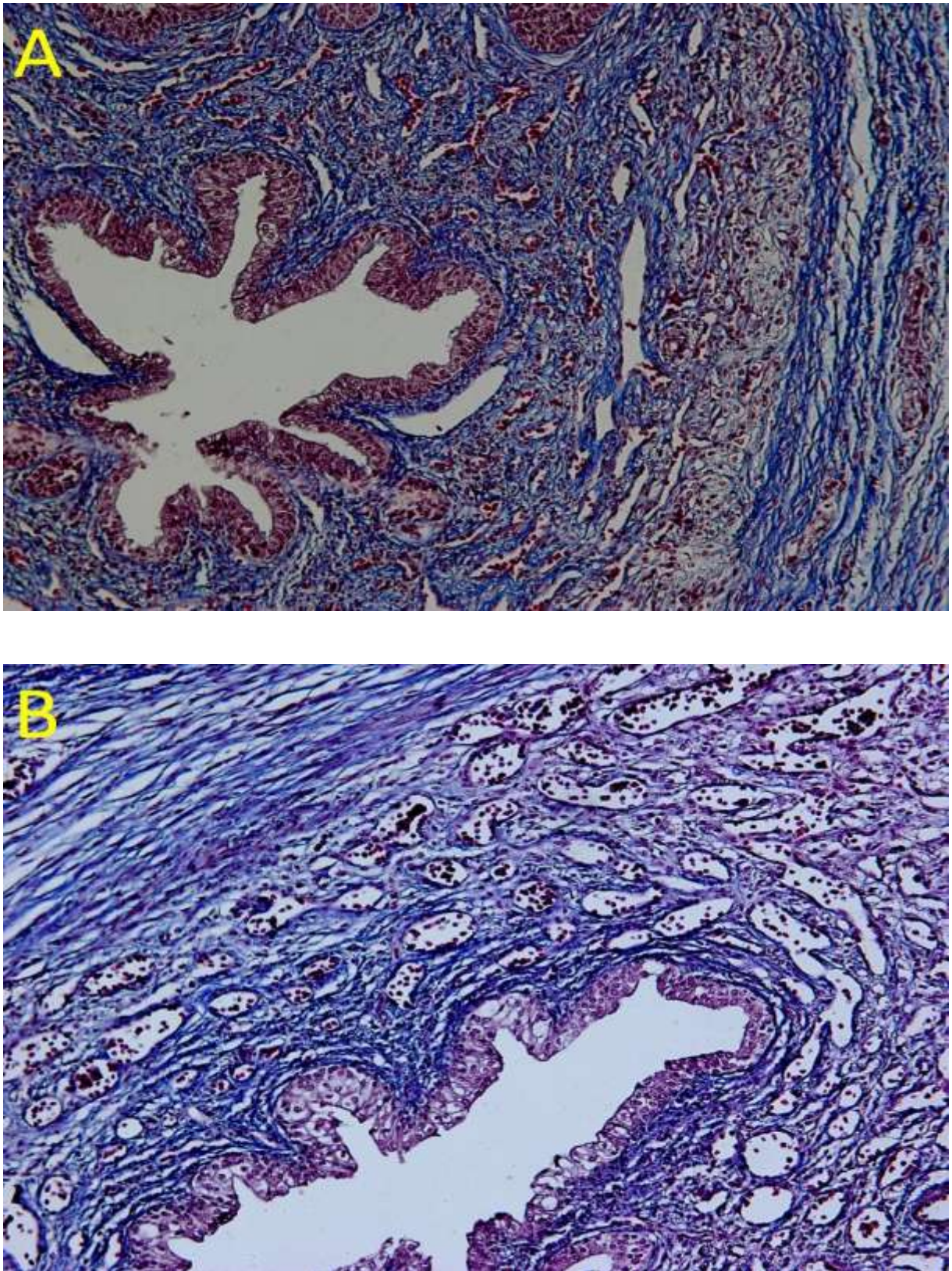


Figura 11-Fotomicrografia tricrômico de Masson objetiva de 40X. A-Corte transversal de uretra de feto 20ª SPC com a disposição do epitélio uretral. B- Corte transversal de uratra de feto de controle, 20ª SPC. Disposição semelhante do epitélio uretral.

O estudo histoquímico com o método da Resorcina Fucsina de Weigert com oxidação prévia pela oxona mostrou resultados duvidosos, uma vez que a marcação para fibras elásticas não foi confirmada (figura 12). Para tanto, foi realizada a marcação com teste imunohistoquímico específico para a elastina, onde a reação tornou-se presente apenas em fetos a partir da 20ª SPC. A marcação, porém, foi positiva tanto em corpos cavernosos (figura 13) quanto em corpos esponjosos (figura 14) de fetos normais e anencéfalos.

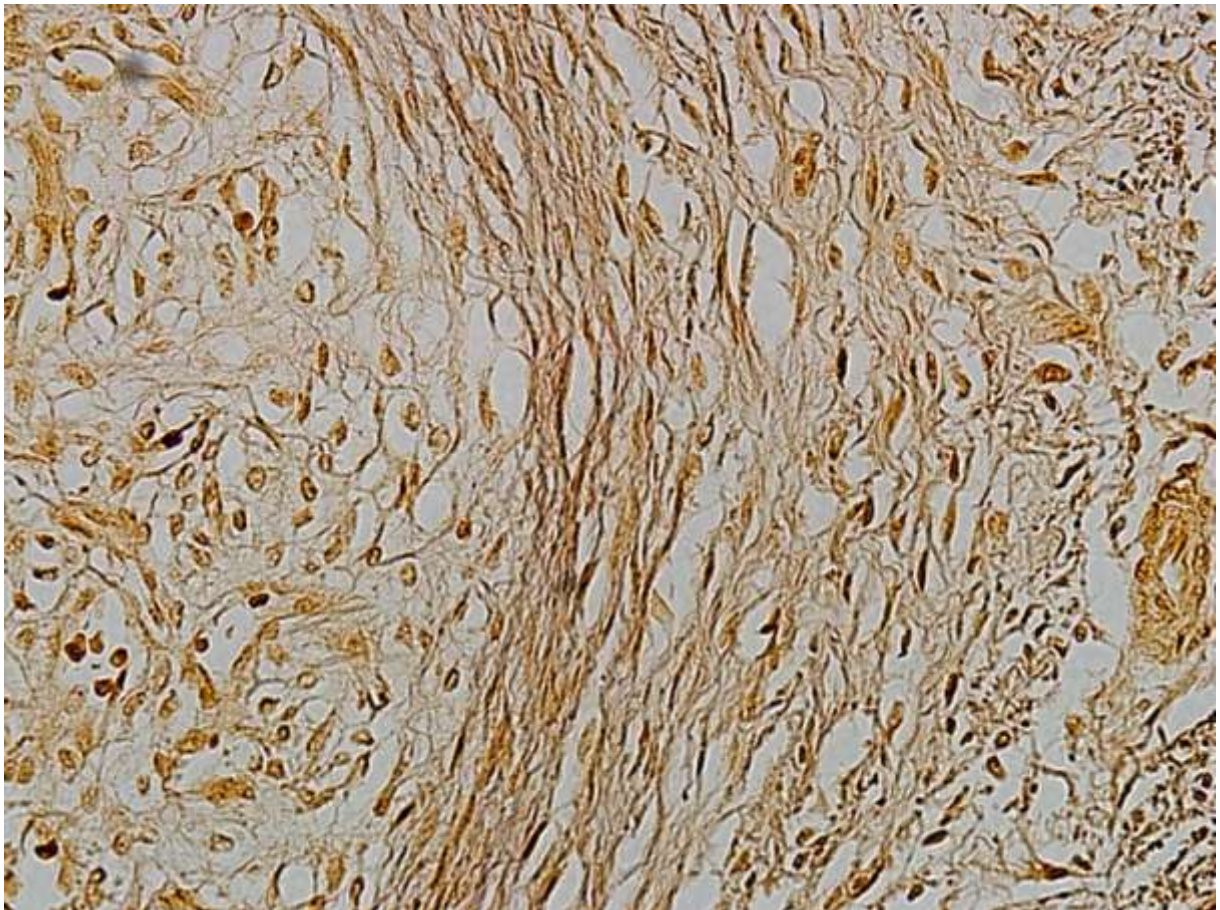


Figura 12-Fotomicrografia Resorcina Fuchsina de Weigert com oxidação prévia pela oxona objetiva de 40X. Feto controle na 22ª SPC, resultado duvidoso para a histoquímica específica para fibras elásticas.

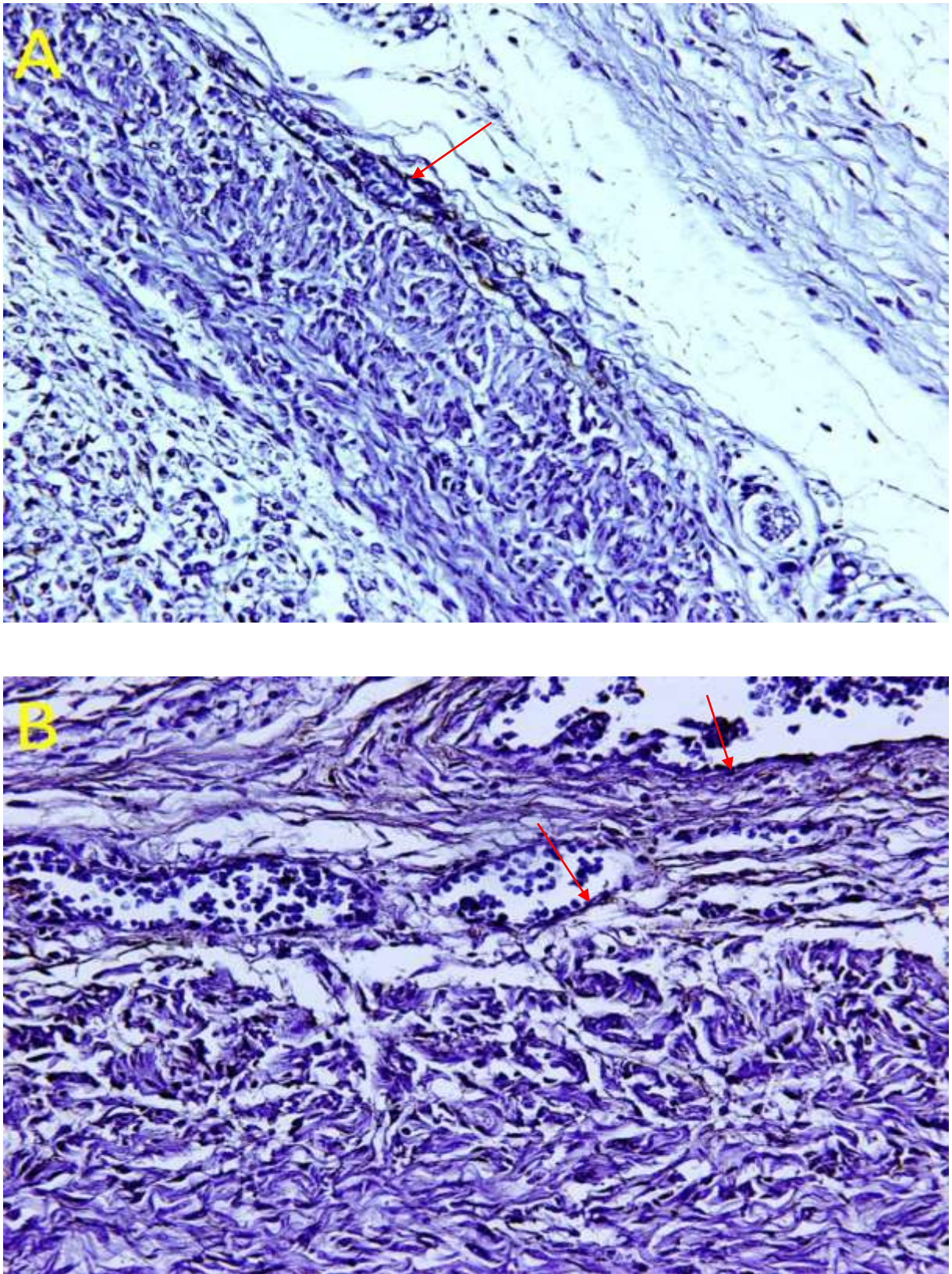


Figura 13-Fotomicrografia com imunomarcção para elastina, objetiva de 40X. A- corpo cavernoso de feto anencéfalo na 20ª SPC e B- corpo cavernoso de feto controle na 22ª SPC. A elastina se encontra marcada (setas vermelhas) na periferia da túnica albugínea.

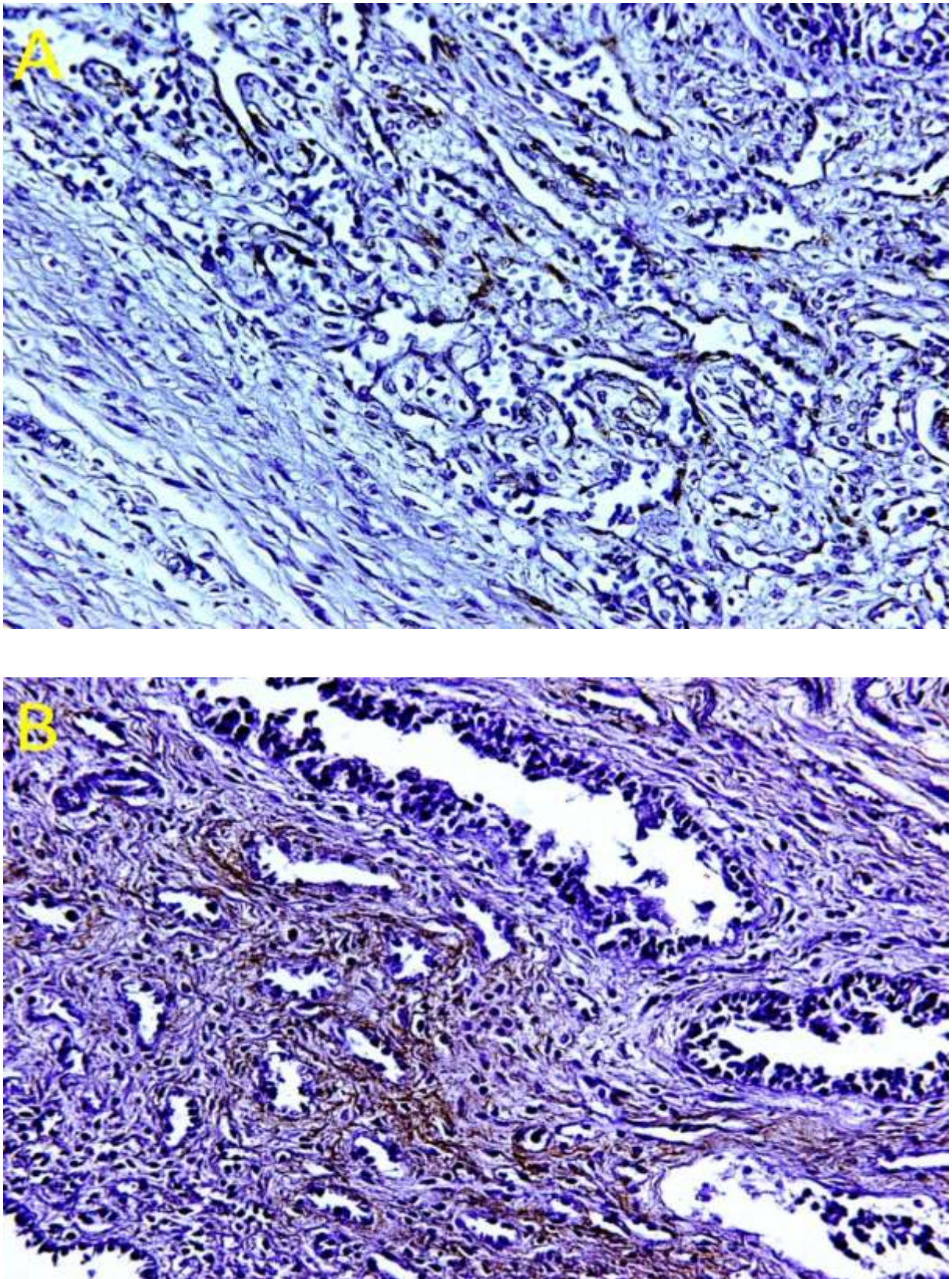


Figura 14-Fotomicrografia imunomarcção para elastina, objetiva de 40X. A- Corpo esponjoso de feto anencéfalo 20ª SPC, B- feto controle na 22ª SPC. A imunomarcção se manifesta em um tom amarronzado, presente em ambas as amostras.

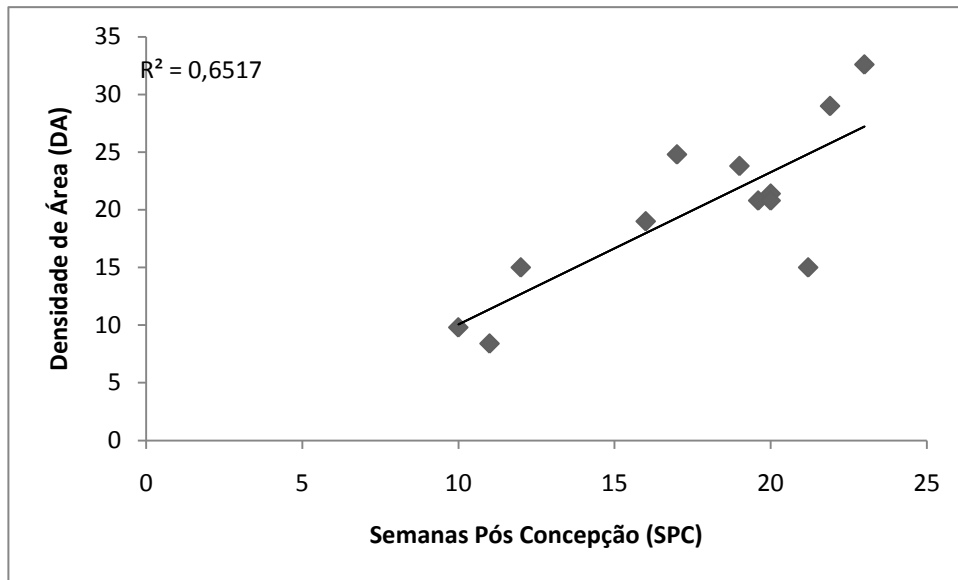
A fim de aferirmos a prevalência dos elementos teciduais versus a idade gestacional, foi realizado um estudo de regressão linear utilizando-se estas duas variáveis.

A densidade de área de cada elemento quantificado (musculatura lisa e tecido colágeno) nos diferentes segmentos estudados (corpo cavernoso e esponjoso) foi atribuída em um gráfico de regressão linear simples correlacionado com a idade gestacional (SPC).

Na análise do corpo cavernoso foi documentado o aumento do tecido colágeno conforme o avanço da idade gestacional com significância estatística ($p < 0,01$) e forte correlação ($R = +0,65$), (gráfico 7). O mesmo estudo documentou o decréscimo da musculatura lisa conforme o avanço da faixa etária ($R = - 0,47$) ($p < 0,01$) (gráfico 8). Os resultados foram confirmados mesmo com a presença de anencefalia.

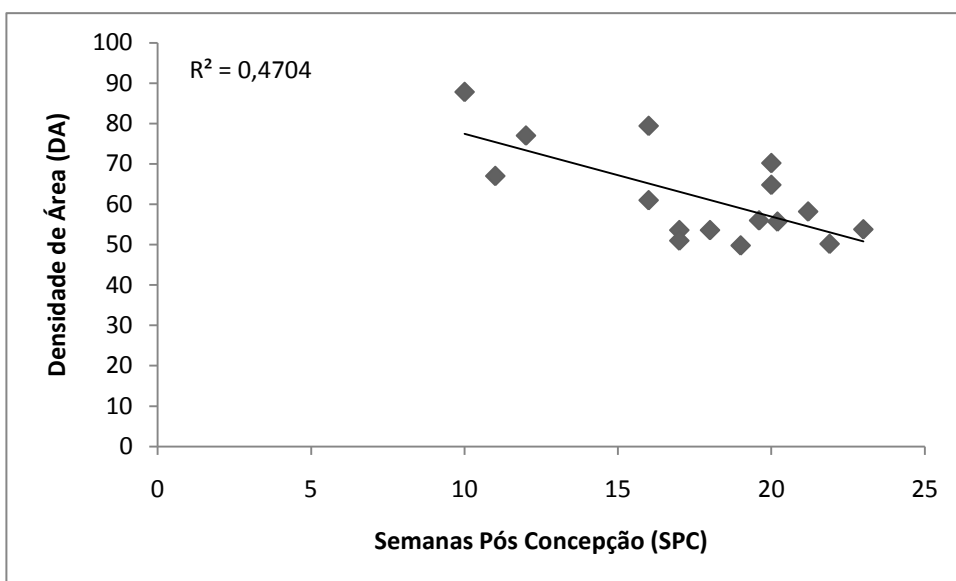
Tal correlação não ocorreu no corpo esponjoso das amostras analisadas por consequência, não houve relevância estatística (gráficos 9 e 10).

Gráfico 7- Regressão Linear Simples- Densidade de Área Tecido Colágeno (Corpo Cavernoso) Vs Idade Gestacional.



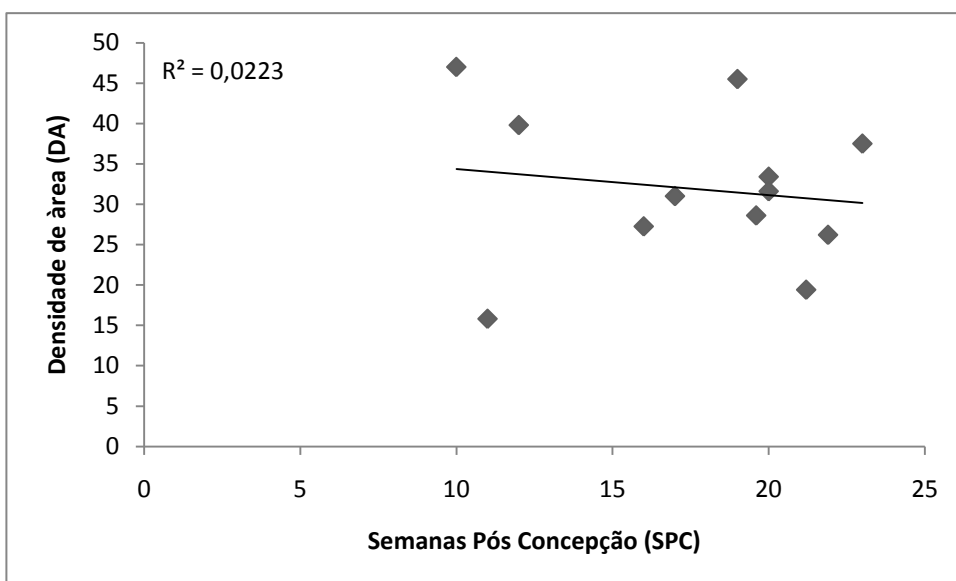
Regressão Linear Simples documentando forte correlação entre o avanço da faixa etária e o aumento da densidade de área do tecido colágeno no corpo cavernoso. O valor de R^2 foi de 0,65 e o $p < 0,01$

Gráfico 8- Regressão Linear Simples- Densidade de Área da Musculatura Lisa (Corpo Cavernoso) Vs Idade Gestacional



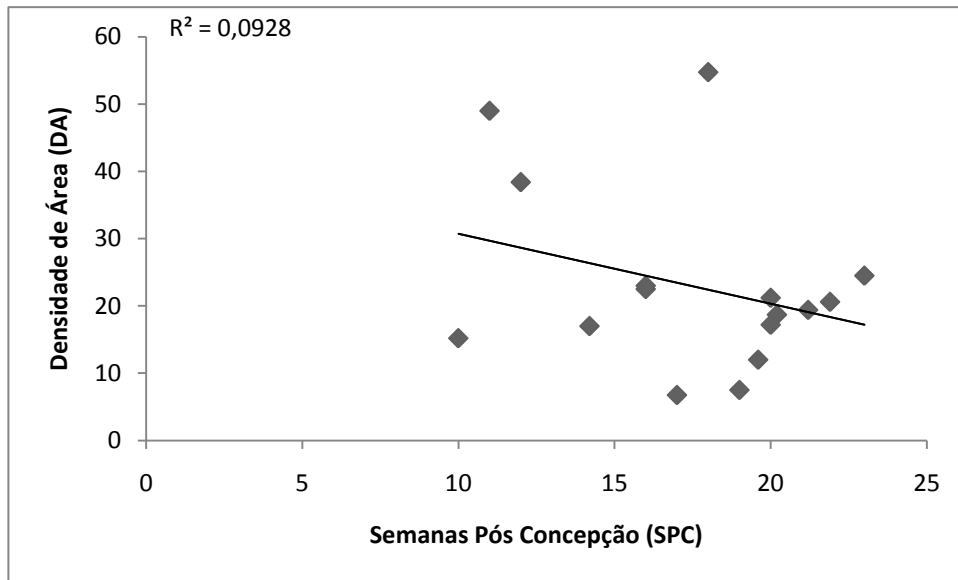
Regressão Linear Simples documentando correlação negativa entre o avanço da faixa etária e a densidade de área da musculatura lisa no corpo cavernoso. O valor de R^2 foi de 0,47 e o $p < 0,01$.

Gráfico 9- Regressão Linear Simples- Densidade de Área do Tecido Colágeno do Corpo Esponjoso Vs Idade Gestacional



Regressão Linear Simples documentando a correlação entre o avanço da faixa etária e a densidade de área do tecido colágeno. Não houve significância estatística e o valor de R^2 foi de 0,0223.

Gráfico 10- Regressão Linear Simples- Densidade de Área da Musculatura Lisa do Corpo Esponjoso Vs Idade Gestacional



Regressão Linear Simples documentando a correlação entre o avanço da faixa etária e a densidade de área da musculatura lisa. Não houve significância estatística e o valor de R^2 foi de 0,09.

7- DISCUSSÃO

O avanço da faixa etária populacional, o aumento da prevalência de doenças crônicas degenerativas e o diagnóstico precoce de doenças hematológicas têm levado ao aumento progressivo da demanda por estudos na área de engenharia tecidual e transplante celular (de Filippis, 2011). Por outro lado, o avanço dos cuidados assistenciais promove a prevalência cada vez maior de pacientes com algum grau de restrição à atividade motora ou com lesões neurológicas incapacitantes, que têm sido vastamente explorados com a utilização de células-tronco, sejam elas provenientes de uma matriz embrionária ou de tecido adulto (Carney e Shah, 2011).

São indiscutíveis as vantagens e progressos que a utilização destes materiais promove nos indivíduos com restrições diversas, no entanto, o emprego do tecido humano na substituição de outros tecidos lesionados não encontra uma linha de pesquisa tão ampla, encontrando-se mais focada na substituição de ossos, cartilagens, revestimento epidérmico e tecido miocárdico (Haraguchi et al, 2011; Pereira et al 2011).

A utilização de modelos cadavéricos humanos, seja de órgãos ou tecidos, confere vantagem em relação aos modelos em que se utilizam animais uma vez que, obviamente, são mais fidedignos e isenta o indivíduo receptor de qualquer zoonose, auxiliando na prevenção de reação imunológica resultante de rejeição de um heteroenxerto (Hashemi et al, 2011).

A questão do uso de tecidos de fetos anencéfalos estaria para, justamente, ser uma fonte de tecido autólogo para estudo ainda sem comprovação de aplicabilidade clínica, onde o indivíduo doador invariavelmente evoluirá para o óbito. O questionamento que se faz é se os tecidos utilizados também sofreriam de más formações encontradas nestes fetos.

No escolpo da urologia, o emprego de genitálias como modelos de estudo encontra vasta aplicabilidade, tendo em vista o elevado grau de disfunção erétil veno oclusiva e às mutilações provocadas por cânceres de pênis e traumatismos externos (Koifman et al, 2011).

Para a avaliação inicial da aplicabilidade do tecido de um feto anencéfalo é importante revisarmos mais uma vez a embriologia. O desenvolvimento peniano tem seu início na 8ª SPC, onde a uretra está completamente formada na 14ª SPC e o prepúcio recobre completamente a glândula na 21ª SPC (Marshall, 1978). Como descrito na introdução, os mecanismos completos para o desenvolvimento da anencefalia são desconhecidos, porém sabe-se que o seu diagnóstico é feito a partir da amniocentese na 10ª SPC e ultrassonografia entre as 14ª e 16ª SPC (Haddow et al, 1994), portanto paralelo ao desenvolvimento da genitália.

A trabécula do corpo cavernoso e a túnica albugínea são as principais estruturas envolvidas no processo erétil. São formadas por células endoteliais, células musculares lisas e matriz extracelular. Os principais componentes desta última são os vários tipos de colágeno, fibras elásticas e glicosaminoglicanos (Bastos et al, 2004). São determinantes também, de sobremaneira, a distribuição vascular venosa e arterial a fim de promover um adequado fluxo sanguíneo para a ereção, que é comprovada por métodos ultrassonográficos ainda no período intra-uterino (Pereira et al, 2001).

Os fetos anencéfalos avaliados não apresentavam qualquer alteração grosseira da anatomia e sua macroscopia genital era idêntica a dos fetos de controle. Não havia a presença de vasos aberrantes ausentes ou supranumerários, sejam arteriais ou venosos. Os septos intercavernosos encontravam-se presentes em ambas as amostras. A anatomia uretral encontra-se mantida em ambos os grupos. Estes resultados sugerem que, preliminarmente, a genitália masculina dos fetos anencéfalos não apresenta diferenças em relação à dos controles.

Estudos prévios de fetos humanos normais comprovaram que a concentração de colágeno aumentou progressivamente e quase dobrou das 17ª a 33ª SPC, sugerindo que mudanças importantes da matriz extracelular da haste peniana ocorrem neste período gestacional. Estas mudanças seriam relacionadas ao processo erétil (Bastos et al, 2005). É importante relatar que o método para a quantificação do colágeno no estudo apresentado pelo autor foi o calorimétrico com hidroxiprolina e o utilizado em nosso estudo foi a quantificação da densidade de área por meio digital, encontrando resultados semelhantes quando utilizada a regressão linear simples.

Estes resultados corroboram que, conforme ocorre a maturação da genitália fetal, há um aumento gradual na concentração do colágeno, ajustando a distribuição dos elementos da haste peniana para a ereção.

Não foram encontradas diferenças na concentração do colágeno em fetos anencéfalos e normais, o que sugere que no tópico específico do tecido colágeno o desenvolvimento da haste peniana encontra-se semelhante em ambas as amostras.

Modelos de pênis de ratos para o desenvolvimento de doença veno oclusiva provocada por *Diabetes Mellitus* e por aterosclerose são extremamente úteis na finalidade de se estudar sua fisiopatologia (Albersen et al, 2011; Ferrini et al, 2009). Porém, é importante salientar que os resultados apresentados nestas duas publicações apontam para um aumento progressivo do colágeno nos estados patológicos, o que não poderia ser transportado como verdade para as hastes penianas de humanos.

As genitálias dos ratos não guardam uma semelhança anatômica tão exacerbada que possa ser utilizada como parâmetro para intervenções clínicas, uma vez que possuem uma estrutura óssea no terço médio da haste peniana (Hsu et al, 2005) Em nossa opinião, isso reforça a importância para a utilização de modelos autólogos como bases para futuras pesquisas, uma vez que, o aumento da concentração do colágeno sugere ser um aspecto fisiológico da genitália masculina não podendo encontrar paralelos em outros mamíferos.

A concentração das células musculares lisas decresceu com o avanço da maturidade fetal, tanto em fetos normais quanto anencéfalos. Estes dados foram confirmados com a aplicação do estudo de regressão linear. Uma vez comparando sua densidade de área, houve um aumento não significativo para os fetos de controle em relação aos anencéfalos, o que poderia ser justificado pela menor faixa etária.

Através do estudo imunohistoquímico e comparando-se a distribuição das células musculares lisas, foi possível observar que nos corpos cavernosos a prevalência destas está na luz dos sinusóides. No corpo esponjoso as fibras musculares se dirigem mais excentricamente em relação à luz uretral.

Esta distribuição divergente poderia ser justificada pela fisiologia de cada estrutura onde, nos corpos cavernosos é necessária uma maior distensibilidade para a manutenção do sangue nestes sinusóides. Nos corpos esponjosos, a distribuição excêntrica destas fibras musculares estaria relacionada ao movimento peristáltico eventual produzido pela uretra (Takaki et al 2010).

Ainda em relação às fibras musculares, a diminuição de sua concentração justifica-se também pelo aumento da espessura da túnica albugínea, rica em colágeno, com o avanço da idade gestacional.

Na avaliação do corpo esponjoso e uretra, não foram observadas alterações da densidade de área em relação ao colágeno e fibras musculares uma vez comparados os grupos de fetos anencéfalos e de controle. Nas análises de regressão linear não houve mudança da densidade destes tecidos em relação ao avanço da idade gestacional. O epitélio uretral encontrava-se íntegro nas duas amostras. A marcação da elastina foi positiva para ambas as amostras apenas a partir da 22^a SPC. Todos estes dados legitimam a afirmação de que não houve diferenças evolutivas no desenvolvimento da uretra em fetos anencéfalos, onde este órgão em particular, poderia ser utilizado para futuros modelos de estudo.

Em um estudo recente foi documentada a presença de alterações morfológicas e histológicas importantes na bexiga de fetos anencéfalos (Pazos et al, 2011). O colágeno era de sobremaneira aumentado nos espécimes de fetos anencéfalos quando comparado aos de fetos normais. As células musculares lisas também se apresentavam com sua densidade volumétrica reduzida.

Neste, foi discutido que o longo intervalo de exposição do sistema nervoso central de fetos anencéfalos ao líquido amniótico com consequente perda da interação neural entre córtex e medula espinhal poderiam ser determinantes para a mudança do feedback neuronal. Esta perda da interação poderia lesar em definitivo a interação dos segmentos nervos pélvicos e sacrais, levando a lesões irreversíveis da bexiga urinária, ainda em uma fase de desenvolvimento intra-uterina.

Os resultados apresentados por nosso estudo sugerem que o desenvolvimento da genitália masculina poderia ocorrer normalmente em paralelo às alterações do sistema nervoso central.

Não houve alterações morfo estruturais nas genitálias de fetos anencéfalos quando comparadas aos de controle. Em tese, a fisiologia da ereção e a capacidade uretral em conduzir fluídos ao meio externo estariam mantidas. Estes dados sugerem que com futuros estudos de biocompatibilidade, a uretra dos fetos ou recém natos anencéfalos poderia ser utilizada na cirurgia reconstrutora, em especial na população pediátrica, tendo em vista o crescente interesse pela engenharia tecidual em tecidos autólogos (Raya-Rivera et al, 2011).

A não lesão da genitália fetal pela exposição do sistema nervoso central ao líquido amniótico sugere que os mecanismos de maturação para esta seriam apenas dependentes da interação hormonal e molecular. A interação dos receptores estrogênicos e androgênicos em órgãos alvo independentemente da interação do sistema nervoso central é bem conhecida em modelos de estudo com ratos (Goyal et al, 2011), porém estudos com humanos são pouco disponíveis na literatura.

O desenvolvimento das fibras elásticas pode ter uma importante participação no mecanismo de maturação da genitália fetal. A presença de elastina, confirmada através de métodos imunohistoquímicos, a partir da 22^a SPC sugere que com o decaimento da concentração das fibras musculares decorrente do avanço da faixa etária, as fibras elásticas possuam uma participação maior no *pool* tecidual.

Esta afirmação é validada por dados publicados por Bastos e colaboradores em 2005. Neste, os autores observaram a presença das fibras elásticas no corpo cavernoso de fetos na 36^a SPC e ainda mais densa e organizada em recém natos. As fibras elásticas aumentam a sua concentração conforme ocorre a distensibilidade tecidual (Tsuruga et al, 2009), fornecendo um dado indireto sobre a integridade da capacidade erétil em fetos e recém nascidos normais.

Entendemos que esta é uma séria restrição ao nosso estudo, uma vez que a nossa amostra era composta por fetos do segundo trimestre de gestação. Porém, nossos resultados são úteis para confirmar a manutenção da capacidade erétil, no aspecto do desenvolvimento das fibras elásticas, uma vez que o incremento destas encontra-se inalterado nos fetos anencéfalos.

Os dados apresentados pelo presente estudo são consistentes para documentar que fetos anencéfalos possuem um desenvolvimento da genitália semelhante ao dos fetos normais.

Entendemos que o limiar para ser considerada a doação tecidual é o critério de morte encefálica, porém este não pode ser aplicado a fetos anencéfalos (Truog e Fletcher, 1989). Apesar da controvérsia jurídica e religiosa, a doação dos tecidos de fetos e recém nascidos anencéfalos deve ser estimulada para que futuros estudos sejam desenvolvidos com o objetivo de avaliar este grupo particular, como fonte de substrato para pesquisas.

8- Conclusões

Não houve diferença na estrutura da genitália entre fetos normais e anencéfalos.

A presença da elastina em fetos a partir da 20ª SPC é um dado objetivo da manutenção da capacidade de ereção nestes grupos.

O aumento do tecido conjuntivo e das fibras elásticas com o decréscimo das fibras musculares no corpo cavernoso sugere que há uma gradual substituição tissular com o avanço da maturação fetal.

O desenvolvimento uretral encontra-se inalterado em fetos anencéfalos.

Deverão ser realizados mais estudos com a finalidade de avaliar a compatibilidade tecidual dos fetos anencéfalos com indivíduos normais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albersen M, Lin G, Fandel TM, Zhang H, Qiu X, Lin CS, Lue TF. Functional, metabolic, and morphologic characteristics of a novel rat model of type 2 diabetes-associated erectile dysfunction. *Urology*. 2001; 78: 476.e1-8.
2. Bioethics Committee, Canadian Paediatric Society: Transplantation of organs from newborns with anencephaly. *Can Med Assoc J*. 1990; 142: 715- 717
3. Blatter, BM, van der Star, M, Roeleveld, N. Review of neural tube defects: risk factors in parental occupation and the environment. *Environmental Health Perspect* 1994; 102: 140-145.
4. Botkin JR: Anencephalic infants as organ donors. *Pediatrics*. 1988; 82: 250-256
5. Badawy H, Soliman A, Ouf A, Hammad A, Orabi S, Hanno A. Progressive hair coil penile tourniquet syndrome: multicenter experience with 25 cases. *J Pediatr Surg*. 2010; 45:1514-1518.
6. Byrne P. Use of anencephalic newborns as organ donors. *Paediatr. Child Health*. 1995; 10: 335-337.
7. Caplan AL. Ethical issues in the use of anencephalic infants as a source of organs and tissues for transplantation. *Transplant Proc*. 1988; 20: 42-49
8. Caplan AL. Should fetuses or infants be utilized as organ donors? *Bioethics*. 1987; 1:119-140

9. Carney BJ, Shah K. Migration and fate of therapeutic stem cells in different brain disease models. *Neuroscience*. 2011 Sep 14. [Epub ahead of print] Disponível em <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21946010>
10. Coop AJ, Brook FA, Estibeiro JP, et al: The embryonic development of mammalian neural tube defects. *Prog Neurobiol*. 1990; 35:363-365.
11. de Filippis L. Neural stem cell-mediated therapy for rare brain diseases: perspectives in the near future for LSDs and MNDs. *Histol Histopathol*. 2011; 26: 1093-1109.
12. Favorito LA, Cardinot TM, Morais ARM, Sampaio FJB Urogenital anomalies in human male fetuses. *Early Human Development*. 2004; 79: 41-47
13. Ferhaan Ahmad: Anencephalic infants as organ, donors: Beware the slippery slope. *CAN MED ASSOC J*. 1992; 146: 236-244
14. Ferrini MG, Kovanecz I, Sanchez S, Umeh C, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Fibrosis and loss of smooth muscle in the corpora cavernosa precede corporal veno-occlusive dysfunction (CVOD) induced by experimental cavernosal nerve damage in the rat. *J Sex Med*. 2009; 6: 415-428.
15. Fletcher JC, Robertson JA, Harrison MR. Primates and anencephalics as sources for pediatric organ transplant: medical, legal and ethical issues. *Fetal Therapy*. 1986; 1: 150-164
16. Fonteles, Cláudio. Parecer do MPF na ADPF nº 54/DF, 2006. Disponível em <r.monografias.com/trabalhos2/legalidade-do-aborto/legalidade-do-aborto2.shtml>

17. Fost N. Removing organs from anencephalic infants: ethical and legal considerations. *Clin Perinatol*. 1989; 16: 331-337
18. Glenister TW: The origin and fate of the urethral plate in man. *J Anat*. 1954; 88: 413–424.
19. Goya HO, Braden TD, Willians CS, Willians JW. Estrogen-induced developmental disorders of the rat penis involve both estrogen receptor (ESR)- and androgen receptor (AR)-mediated pathways. *Biol Reprod*. 2009; 81:507-516.
20. Gray's Anatomy 29a ed, 1977. Ed Guanabara Koogan. Disponível em <education.yahoo.com/reference/gray/subjects/subject/262>
21. Haddow JE, Polomaki GE, Knight GJ, et al. Reducing the need for amniocentesis in women 35 years of age or older with serum marker for screening. *New Engl J Med*. 1994; 330: 1114-1120.
22. Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Regenerative therapies using cell heet-based tissue engineering for cardiac disease. *Cardiol Res Pract*. 2011; 2011 e:845170. Epub 2011.
23. Harrison MR, Meilaender G. The anencephalic newborn as organ donor. *Hastings Cent Rep*. 1986; 16: 21-23
24. Harrison MR: Organ procurement for children: the anencephalic fetus as donor. *Lancet*. 1986; 2: 1383-1385

25. Hashemi SM, Soudi S, Shabani I, Naderi M, Soleimani M. The promotion of stemness and pluripotency following feeder-free culture of embryonic stem cells on collagen-grafted 3-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials*. 2011; 32: 7363-7374.
26. Helzlsouer W, Beller FK, Bucholz B et al: Kidney transplantation from anencephalic donors. *N Engl J Med*. 1987; 316: 169-170
27. Hern, WM. Correlation of fetal age and measurements between 10 and 26 weeks of gestation. *Obst Gynecol*. 1984; 63: 26-32.
28. Hsu GL, Lin CW, Hsieh CH, Hsieh JT, Chen SC, Kuo TF, Ling PY, Huang HM, Wang CJ, Tseng GF. Distal ligament in human glans: a comparative study of penile architecture. *J Androl*. 2005; 26: 624-628.
29. Kurzrock EA, Baskin LS, Cunha GR. Ontogeny of the male urethra: theory of endodermal differentiation. *Differentiation*. 1999; 64: 115-122.
30. Kalaycıoğlu A, Karaca M, Can I, Keles ON, Üçüncü Y, Gündoğdu C, Uyanık A, Bünyami ÜB. Anencephalic fetuses can be an alternative for kidney transplantation: a stereological and histological investigation. *Histol Histopathol*. 2010; 25: 413-422.
31. Landwirth J. Should anencephalic infants be used as organ donors? *Pediatrics*. 1988; 2: 257-259
32. Leggans T. Anencephalic infants as organ donors: legal and ethical perspectives. *J Leg Med* 1988; 9: 449-465
33. Ronald J Lemire. Neural Tube Defects *JAMA*. 1988;259(4):558-562. doi: 10.1001/jama.1988.03720040050026 1988.

34. Lobach DF, Rochelle JM, Watson ML, Seldin MF, Blackshear PJ. Nucleotide sequence, expression, and chromosomal mapping of Mrp and mapping of five related sequences. *Genomics*. 1993; 17: 194– 204.
35. Marshall, EF. Embryology of the lower genitourinary tract. *Urol Clin North Am*. 1978; 5: 3-15.
36. Meller SM, Coppe MR, Ito S, Waterman RE. Transmission electron microscopy of critical point dried tissue after observation in the scanning electron microscope. *Anat Rec*. 1973; 176: 245-252.
37. Mercer BM, Sklar S, Shariatmadar A, Gillieson MS, D'Alton MK. Fetal foot length as a predictor of gestational age. *Am J Obst Gynecol*. 1987; 156: 350-356.
38. Milliez, J. Anencephaly and organ transplantation. *Int J. Gyn and Obst*. 2008; 102: 99-104.
39. Medearis DN, Holmes LB. On the use of anencephalic infants as organ donors. *N Engl J Med*. 1989; 321: 391- 393
40. Moore Keith L, Persaud T V N, Torchia Mark, G. Before we are born: essentials of embryology and birth defects. 8th ed. Philadelphia, PA. Saunders/Elsevier, © 2012.
41. O'Rahilly R, Muller F. The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo. *Teratology*. 2002; 65: 162–170.

42. Peabody JL, Emery JR, Ashwal S: Experience with anencephalic infants as prospective organ donors. *N Engl J Med*. 1989; 321: 344-350
43. Pedreira DA, Yamasaki A, Czeresnia CE. Fetal phallus 'erection' interfering with the sonographic determination of fetal gender in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001;18 : 402-404.
44. Pereira H, Frias AM, Oliveira JM, Espregueira-Mendes J, Reis RL. Tissue Engineering and Regenerative Medicine Strategies in Meniscus Lesions. *Arthroscopy*. 2011 Oct 19. Disponível em <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019234>.
45. Pinotti, José Aristodemo, Projeto de lei Nº 4360, DE 2004.
46. Platt LD, Medearis AL, DeVore GR, Horenstein JM, Carlson DE, Brar HS. Fetal foot length: Relationship to menstrual age and fetal measurements in the second trimester. *Obstet Gynecol*. 1988; 71: 526-531.
47. Purves D, Lichtman JW in *Principles of Neural Development*. Sinauer Assocs; Sunderland. 1985
48. Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet*. 2011; 377:1175-1182.

49. Ravasi T, Suzuki H, Cannistraci CV, Katayama S, Bajic VB, et al. An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell*. 2010; 5;140(5):744-52.

50. Regadas, RP, Moraes, ME, Mesquita FJ, Cerqueira, JB, Gonzaga-Silva LF. Experimental model of human corpus cavernosum smooth muscle relaxation. *Int. Braz. J Urol*. 2010; 36: 490-496.

51. Rizvi SA, Naqvi SA, Zafar MN, Hussain Z, Hashmi A, Hussain M, Akhtar SF, Ahmed E, Aziz T, Sultan G, Sultan S, Mehdi SH, Lal M, Ali B, Mubarak M, Faiq SM. A Renal Transplantation Model for Developing Countries. *Am J Transplant*. 2011 Aug 22. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03712.x.

52. Rothenberg LS. The anencephalic neonate and brain death: an international review of medical, ethical, and legal issues. *Transplant Proc*. 1990; 22: 1037-1039

53. Salaman, JR. Anencephalic organ donors. *BMJ*. 1989; 298: 622-623.

54. Schoenwolf, Gary C, Larsen William J. in *Larsen's human embryology*. Philadelphia, PA : Elsevier/Churchill Livingstone, c2009

55. Shewmon DA, Capron AM, Peacock WJ et al. The use of anencephalic infants as organ sources: a critique. *JAMA* .1989; 261: 1773-1781

56. Shewmon DA: Anencephaly: selected medical aspects. *Hastings Cent Rep* 1988; 18: 11-18

57. Shinnar S, Arras J. Ethical issues in the use of anencephalic infants as organ donors. *Neurol Clin*. 1989; 7: 729-743

58. Singer P. Sanctity of life or quality of life? *Pediatrics*. 1983; 72: 128-129
59. Soleimani R, Heytens E, Oktay K. Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS One*. 2011. 29;6: e19475.
60. Takaki M, Suzuki H, Nakayama S Recent advances in studies of spontaneous activity in smooth muscle: ubiquitous pacemaker cells. *Prog Biophys Mol Biol*. 2010; 102: 129-135
61. Tolmie, J. Emery A, Rimoin P. Principles and practice of medical genetics. Churchill Livingstone; New York: 1996. Neural tube defects and other congenital malformations of the central nervous system; p. 2152
62. Truog RD, Fletcher JC. Anencephalic newborns: can organs be transplanted before brain death? *N Engl J Med*. 1989; 321: 388-390

ANEXO I CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Rio de Janeiro, 23 de Novembro de 2010

Do: Comitê de Ética em Pesquisa

Prof.: Wille Oigman

Para: Aut. João Paulo Martins de Carvalho – Orient. Prof. Luciano Alves Favorito / PG Fisiologia

Registro CEP/HUPE: 2585/2010 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)

CAAE: 0048.0.228.325-10

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "ESTUDO ESTRUTURAL E ONTOGENÉTICO DO PÊNIS DE FETOS HUMANOS NORMAIS, ANENCÉFALOS E COM MIELOMENINGOCELE NO SEGUNDO TRIMESTRE DE GESTAÇÃO" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.

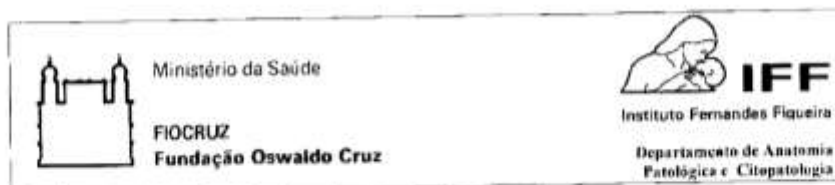
O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HUPE/UERJ

ANEXO II- TERMO DE COOPERAÇÃO INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA- UERJ



Rio de Janeiro 5 de outubro de 2010

Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Ilmo Chefe do Departamento de Anatomia Humana

Em conformidade com a legislação Lei nº 8.501, de 30 de novembro de 1992 em seu artigo quarto, efetivamos a doação de fetos, relacionados em anexo, à Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ – para fins de pesquisa e estudos.


Dra. Elide Gomes
Chefe do Departamento

APÊNDICE A- ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO JOURNAL OF SEXUAL MEDICINE- (JSM- 07-2011-439-R1).

30-Aug-2011

Dear Dr. Favorito:

CONGRATULATIONS!!

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "ANENCEPHALY DOES NOT CAUSE STRUCTURAL ALTERATIONS IN THE FETAL PENIS" in its current form for publication in the Journal of Sexual Medicine.

You MUST now complete two important tasks (if you have not already done so):

- (1) Ensure all Copyright Assignment Forms are returned to the Editorial Office
- (2) The corresponding or submitting author MUST complete the Author Declaration Form on behalf of all authors

You must now ensure that EVERY author of this manuscript signs and returns, either by mail or fax, the JSM Copyright Assignment Form. Failure to do so will mean your manuscript will not be published. Each author in signing the form agrees that they have contributed to the paper and have approved the manuscript before submission. A copy of the form is attached to this email.

Completion of the Copyright Transfer Agreement is a critical task and I urge you to attend to it as a priority matter. In the meantime, to speed the publication process up, could I request that you, as the corresponding author, print, sign and fax a copy of the Copyright Transfer Agreement to the editorial office fax at [\(+1\) 508-242-1184](tel:+15082421184).

Please note that there are charges associated with the publication of color figures. If you have submitted color figures, please download, complete, and return the color agreement form. The journal is always interested in receiving supplementary materials (appendices such as large data files, videos and sample questionnaires). We will be able to publish these with the online version of your article. If you have any such files, please email it to the editorial office at jsm@issm.info

As the Corresponding Author you must also ensure a signed copy of the attached Author Declaration form is completed. Failure to return this form, or the return of an incomplete form, will result in the delayed publication of your manuscript.

You can now track the production of your article using Blackwell Publishing's Author Services. With Author Services, you can check the status of your article online, choose to receive automated e-mails at key stages of production, and receive free access to your article. When your article has been submitted to Blackwell Publishing, you will receive an e-mail with a unique code that automatic

APÊNDICE B- Artigo publicado durante a realização da disciplina participação didática na graduação (Anatomic Aspects os Ingional Lymph Nodes Applied to Lymphadenectomiy in Penile Cancer)