



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Thiago da Silveira Antoniassi

Avaliação do Efeito do Micofenolato Mofetil na
Túnica Albugínea do Pênis de Ratos após Indução
da Doença de Peyronie com TGF- β

São José do Rio Preto

2017

Thiago da Silveira Antoniassi

Avaliação do Efeito do Micofenolato Mofetil na
Túnica Albugínea do Pênis de Ratos após Indução
da Doença de Peyronie com TGF- β

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de São
José do Rio Preto para obtenção do
Título de Mestre no Programa de
Pós-graduação em Ciências da
Saúde. Eixo Temático: Medicina
Interna

Orientador: Prof. Dr. Fernando Nestor Facio Junior

Co-Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

São José do Rio Preto

2017

Antoniassi, Thiago da Silveira
Avaliação do efeito do Micofenolato Mofetil na túnica albugínea do
pênis de ratos após indução da Doença de Peyronia com TGF- β .
São José do Rio Preto, 2017
30p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio
Preto – FAMERP
Eixo Temático: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Fernando Nestor Facio Junior
Co-orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

1. Doença de Peyronie; 2. TGF- β ; 3. Micofenolato Mofetil.

Thiago da Silveira Antoniassi

Avaliação do Efeito do Micofenolato Mofetil na
Túnica Albugínea do Pênis de Ratos após Indução
da Doença de Peyronie com TGF- β

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Fernando Nestor Facio jr.

2º Examinador: Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior

3º Examinador: Prof. Dr. Antonio Barbosa de Oliveira Filho

Suplentes: Prof. Dr. José Germano Ferraz de Arruda
Prof. Dr. Ricardo Alexandre Fochi

São José do Rio Preto, 16/10/2017.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
EPÍGRAFE	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELA.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO.....	6
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3. RESULTADOS.....	12
4. DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÕES.....	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
ANEXO 1.....	30

*A Deus, minha família, minha esposa Roberta
e a todos que de forma direta ou indireta
contribuíram para a conclusão dessa dissertação.*

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fernando Nestor Facio Jr.** pela parceria e incentivo, sobretudo pelos ensinamentos e orientações que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo. Obrigado, por acreditar no meu trabalho e por compartilhar seus conhecimentos. E nos últimos dois anos por sua dedicação, disponibilidade e principalmente por sua paciência.

Ao **Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga** por ter me recebido de braços abertos e sempre bem-humorado, pela co-orientação, pelo auxílio, incentivo e por ter cedido seu laboratório e os materiais necessários para que meu projeto fosse desenvolvido, assim como as horas de trabalho. Obrigado por sempre esclarecer minhas dúvidas, por mais simples que fossem, e pela paciência em ficar horas olhando lâminas procurando sempre as melhores imagens para ilustrar o trabalho.

Aos professores titulares e suplentes da **banca examinadora** desse trabalho pela disponibilidade e pelas contribuições que, certamente, enriquecerão ainda mais meu trabalho.

Aos amigos e urologistas **Pedro Paulo Poloto e Fernando Buchalla Campos**, que me auxiliaram na execução desse projeto e incentivaram para a conclusão do mesmo.

Aos amigos, **Luis Roberto Falleiros Jr. e Luis Guerra** do Laboratório de Microscopia e Microanálise do IBILCE/UNESP, os quais conheci durante minhas horas de estudos, proporcionando ótimo ambiente de trabalho com descontração e conhecimentos teórico-práticos contribuindo muito para a conclusão desse estudo.

Ao **Prof. Dr. Luís Carlos de Mattos** da FAMERP que sempre me incentivou e me recebeu de braços abertos em seu laboratório para tirar dúvidas e me ensinar a diluir as drogas corretamente.

Aos **docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** que contribuíram para o aperfeiçoamento dos meus conhecimentos e, conseqüentemente, para minha formação profissional.

Ao **Sr. Bizuti e ao Pedro** por toda a ajuda e disposição contribuindo com toda a sua sabedoria e experiência relacionada ao uso de animais.

Ao **Prof. Dr. Renato Braz de Araújo** pelo auxílio na montagem e formatação dessa dissertação.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização desse projeto.

Em especial, agradeço...

A **Deus** por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais **Valdecir e Ramira** que não me deram apenas a vida, mas também a educação e as condições de estudo, e que me ensinaram a fazer tudo da melhor forma possível, com dignidade e honestidade, confiando em mim e me apoiando para que eu conseguisse realizar os meus sonhos. Obrigado por sempre estarem presentes.

Ao meu irmão **Rodrigo** que mesmo de longe sempre me apoiou e incentivou em minhas escolhas. Obrigado pelo companheirismo, pela amizade, pelas alegrias e, sobretudo, por me entender.

À **minha família** e aos **amigos** por todo apoio, amor desprendido e amizade que perdura há anos, por todos os nossos encontros, os quais nos aproximaram e permitiram que compartilhássemos bons momentos, mesmo estando longe.

À minha esposa **Roberta**, que me fez buscar, me fez acreditar, me fez crescer e não me deixou desistir, jamais imaginaria minha vida sem você. Que esta nova etapa seja nossa, pois tenho certeza que não cheguei até aqui sozinho, e espero que você esteja ao meu lado nas próximas conquistas e por toda minha vida.

*“Se hoje enxergo mais longe é porque
me apoiei sobre ombro de gigantes.”*

Isaac Newton

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Histograma dos valores médios \pm desvio padrão da angulação peniana ($^{\circ}$) nos animais em diferentes condições experimentais. Abaixo dos histogramas estão representados pelas fotografias de pênis com diferentes comportamentos de curvatura mais representativos nos grupos. 13
- Figura 2 - Secções transversais em pênis de rato nas diferentes condições experimentais. Nas secções observam-se as diferentes localizações dos tecidos penianos: TA = túnica albugínea, TE = tecido erétil, U= uretra peniana. 14
- Figura 3 - Distribuição das fibras conjuntivas na região da túnica albugínea peniana nas diferentes condições experimentais. A coluna da esquerda evidencia a distribuição das fibras elásticas pelo método da Hematoxilina-Eosina em microscopia de fluorescência (seta grossa), observe a fragmentação da elastina nas condições de tratamento pelo TGF- β e no MIC-7d. A coluna da direita evidencia a distribuição das fibras coradas pela técnica da reticulina de Gömöri (fibras de colágeno I – asterisco; fibras reticulares (colágeno III) – seta fina). Vs = vasos sanguíneos, El = elastina. 16

- Figura 4 - Histograma de frequências relativas de fibras elásticas (elastina) (%) na tunica albugínea peniana nas diferentes condições experimentais. Os dados estão expressos pelo valor das médias \pm desvio padrão e o * indica diferença estatisticamente significativa em valor de $p \leq 0,05$. 17
- Figura 5 - Histograma de frequências relativas de fibras colágenas (Colágeno tipo I) (%) na tunica albugínea peniana nas diferentes condições experimentais. Os dados estão expressos pelo valor das médias \pm desvio padrão e o * indica diferença estatisticamente significativa em valor de $p \leq 0,05$ 19
- Figura 6 - Histograma de frequências relativas de fibras reticulares (Colágeno tipo III) (%) na túnica albugínea peniana nas diferentes condições experimentais. Os dados estão expressos pelo valor das médias \pm desvio padrão e o * indica diferença estatisticamente significativa em valor de $p \leq 0,05$. 20

LISTA DE TABELA

Tabela 1 –	Avaliação estereológica dos elementos fibrilares colagênicos da túnica albugínea nos diferentes grupos do estudo. Dados da média \pm desvio padrão das fibras reticulares.	21
------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DD	doença de Dupuytren
DP	doença de Peyronie
EI	elastina
Et al.	colaboradores
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HE	hematoxilina-eosina
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
MMF-7d	grupo que recebeu micofenolato mofetil após 7 dias
MMF-30d	grupo que recebeu micofenolato mofetil após 30 dias
MMF	micofenolato mofetil
p	probabilidade de significância
TA	túnica albugínea
TE	tecido erétil
TGF- β	fator transformante de crescimento beta
UNESP	Universidade Estadual Paulista
U	uretra peniana
Vs	vasos sanguíneos
%	porcentagem
°	grau

RESUMO

Introdução: Doença de Peyronie (DP) é definida como fibrose adquirida da túnica albugínea, podendo resultar em dor, tortuosidade e disfunção erétil. Atualmente, o tratamento da DP é controverso, pois as drogas orais apresentam eficácia limitada.

Objetivo: Avaliar as alterações histológicas, histoquímicas e estereológicas provocadas pelo Micofenolato Mofetil (MMF) sobre a túnica albugínea do pênis de ratos submetidos à injeção de TGF- β para indução da Doença de Peyronie. **Material e**

método: Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos adultos, pesando em média 469g, divididos em 4 grupos. Grupo Controle: animais livres de manuseio experimental; Grupo 1 TGF- β : animais que receberam injeção do TGF- β ; Grupo 2 MMF-7d: animais tratados com MMF após 7 dias de indução com TGF- β e, Grupo 3 MMF-30d: animais tratados com MMF, após 30 dias de indução com TGF- β . A mensuração da avaliada da angulação do pênis foi feita antes da coleta do material para o processamento histológico. Os pênis foram fotografados, sendo as imagens mensuradas em programa computacional. O processamento de cortes histológicos foi analisado em microscópio de luz convencional e também em sistema de fluorescência acoplado ao mesmo aparelho. A avaliação estereológica incluiu volume relativo dos diferentes tipos de fibras conjuntivas da túnica albugínea peniana. A análise dos dados da angulação peniana e as avaliações estereológicas foram efetuadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) e teste de Mann-Whitney. **Resultados:** Na avaliação histoquímica, evidenciou-se inicialmente uma fragmentação e degradação da elastina na região da túnica albugínea. Esse processo foi incompletamente revertido no grupo MMF-7d. No grupo MMF-30d, observou-se uma

situação muito próxima à normalidade. Houve também uma inversão na relação colágeno III/colágeno I com aumento dessa relação nos grupos TGF- β e MMF-7d e diminuição no grupo MMF-30d aproximando-se da normalidade. A mensuração da curvatura peniana demonstrou diminuição no valor médio do ângulo no grupo TGF- β e aumento nos grupos MMF-7d e MMF-30d. **Conclusão:** A injeção intratúnica de TGF- β foi capaz de gerar alterações fibróticas na região da túnica albugínea peniana em rato Wistar, correspondente à DP. Neste modelo de indução de DP em rato Wistar pela injeção de TGF- β , o MMF atua como agente antifibrótico regenerador.

Palavras-chave: Doença de Peyronie, TGF- β , Micofenolato Mofetil

ABSTRACT

Introduction: Peyronie's disease (PD) is defined as an acquired fibrosis of the tunica albuginea, which can result in pain, deformity and erectile dysfunction. Currently, PD treatment is controversial because oral therapies present limited efficacy. **Aim:** : To evaluate the histological, histochemical and stereological changes caused by Mycophenolate Mofetil (MMF) on the tunica albuginea of the rats peniles submitted to TGF- β injection for Peyronie's Disease induction. **Methods:** Twenty adult male Wistar rats weighing on average 469g were divided into 4 groups. Group Control: animals free of experimental handling; Group 1 TGF- β : animals received injection of TGF- β ; Group 2 MMF-7d: animals treated with MMF after 7 days of induction with TGF- β and, Group 3 MMF-30d: animals treated with MMF after 30 days of induction with TGF- β . The measurement of penile curvature was performed before material collecting for histological processing. Penises were photographed and the images measured in computational software. Processing of histological sections was analyzed in conventional light microscope and in fluorescence system coupled with the same microscope. Stereological evaluation included the relative volume of different types of connective fibers of the penile tunica albuginea. Data analysis of penile curvature and stereological evaluation was performed using analysis of variance (ANOVA) and Mann-Whitney test. **Results:** Firstly, the histochemical assessment showed a fragmentation and a degradation of elastin in the tunica albuginea region. This process was incompletely reversed in the MMF-7d group. In MMF-30d group, a situation very close to normality was observed. An inversion was observed in the collagen III/collagen I ratio with an increase of this ratio

in TGF- β and MMF-7d groups, and a decrease in the MIC-30d group approximating to the normality. Penile angle measurement showed decreasing in the mean angle value in the TGF- β group and increasing in the MMF-7d and MMF-30d groups. **Conclusion:** Intratunical injection of TGF- β was able to promote fibrotic alterations in the region of penile tunica albuginea in Wistar rat, corresponding to PD. In this model of induction of PD in Wistar rat by TGF- β injection, the MMF acts as a regenerating antifibrotic agent.

Keywords: Peyronie's disease, TGF- β , Mycophenolate mophetil