



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

Thiago da Silveira Antoniassi

**Alterações na matriz extracelular em modelo
animal da doença de Peyronie e os efeitos do
tratamento pelo Micofenolato Mofetil.**

São José do Rio Preto

2024

Thiago da Silveira Antoniassi

Alterações na matriz extracelular em modelo animal da doença de Peyronie e os efeitos do tratamento pelo Micofenolato Mofetil.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Fernando Nestor Facio Junior

Coorientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

São José do Rio Preto

2024

Antoniassi, Thiago da Silveira

Alterações na matriz extracelular em modelo animal da doença de Peyronie e os efeitos do tratamento pelo Micofenolato Mofetil. São José do Rio Preto, 2024.

38p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Fernando Nestor Facio Junior

Coorientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

1. Doença de Peyronie; 2. TGF- β ; 3. Micofenolato Mofetil; 4. Metaloproteases de Matriz.

Thiago da Silveira Antoniassi

Alterações na matriz extracelular em modelo animal da doença de Peyronie e os efeitos do tratamento pelo Micofenolato Mofetil.

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

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

Co-orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

2º Examinador: Prof. Dra. Patricia Simone Leite Vilamaior

3º Examinador: Prof Dr. Pedro Ferraz de Arruda

4º Examinador: Prof. Dr. Adriano Fregonesi

5º Examinador: Prof. Dr. Luis Cesar Fava Spessoto

Suplentes: Prof. Dr. Rui Nogueira Barbosa

Profª. Dra. Silvana Gisele Pegorin de Campos

São José do Rio Preto, 06/08/2024.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
EPÍGRAFE	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELA.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO.....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3. RESULTADOS.....	14
4. DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÕES.....	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
ANEXO 1.....	38

*A Deus, minha família, minha esposa Roberta,
minha filha Ana Luiza e a todos que de forma direta
ou indireta contribuíram para a conclusão desta Tese.*

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 quatro anos por sua dedicação, disponibilidade e ,principalmente, por sua paciência.

Ao **Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga** por ter me recebido de braços abertos sempre bem-humorado, pela coorientação, pelo auxílio, incentivo e por ter cedido seu laboratório e os materiais necessários para que o 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** deste trabalho pela disponibilidade e pelas contribuições que, certamente, enriqueceram ainda mais meu trabalho.

Aos amigos, **Thalles Fernando Rocha Ruiz, Luís Roberto Falleiros e Simone Jacovaci Colleta** do Laboratório de Microscopia e Microanálise do IBILCE/UNESP, que me auxiliaram na execução desse projeto e incentivaram para a sua conclusão sempre proporcionando ótimo ambiente de trabalho com descontração e conhecimentos teórico-práticos, contribuindo muito para a conclusão deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Luís Carlos de Mattos** da FAMERP que sempre me incentivou e me recebeu de braços abertos em seu laboratório sanando minhas dúvidas e me ensinando a restituir corretamente as drogas utilizadas no estudo.

Aos **docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** que contribuíram para o aperfeiçoamento dos meus conhecimentos e ampliação dos meus horizontes com temas diversos, e consequentemente, para minha formação profissional.

Aos funcionários do Biotério da UNESP/IBILCE por fornecer espaço físico e auxiliar na condução do estudo e cuidado aos animais, contribuindo com toda a sua sabedoria e experiência relacionadas ao uso de animais.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a 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.

À minha filha **Ana Luíza**, que me deu um novo significado para a vida, fez-me crescer como pessoa e me ensinou um novo significado para o amor. Com um simples sorriso ela conseguia me dar forças para continuar trabalhando e seguir em frente.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martim Luther King

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Delineamento Experimental. O desenho experimental apresenta 4 grupos principais - controle, SHAM, TGF- e TGF- + MMF - sendo divididos os últimos em subgrupos de sete e 30 dias, após indução e tratamento. Pg. 9
- Figura 2 - Aspectos histológicos dos elementos fibrilares da túnica albugínea de ratos induzidos a DP e tratados com MMF. **(A)** Fibras colágenas do tipo I e III. As Figuras de cada um dos grupos mostram as colorações por picrossírius em luz convencional e polarizada e pela técnica de reticulina de Gomori, revelando os colágenos I e III, respectivamente. **(B e C)** Análise quantitativa da distribuição dos elementos fibrilares colagênicos na túnica albugínea. Os gráficos apresentam médias $\pm$ SD do quantitativo de colágeno I (vermelho) e colágeno III (cinza) nos diferentes grupos. Diferentes letras (^{a, b, c}) demonstram diferença significativa entre os grupos experimentais, sendo as comparações realizadas separadamente entre colágeno tipo I (barras vermelhas) e colágeno tipo III (barras em cinza). As comparações entre a frequência

relativa (%) dos tipos de colágeno foram demonstradas nas barras superiores, sendo as diferenças estatísticas demonstradas por asteriscos (***) $p < 0,005$). (C) Razão entre colágeno III e I. O Gráfico apresenta os dados em box plot (mediana; quartis 25/75%) relacionados à distribuição das médias dos indivíduos de cada grupo experimental (pontos). A comparação estatística foi demonstrada pelas barras superiores e asteriscos (** $p < 0,01$) e as comparações entre grupos com mesmo tempo de tratamento (7 ou 30 dias) foi expresso com (*) no grupo que apresentou maior valor de média e diferença significativa. *Grupos experimentais: Controle, Sham, TGF β -7D, TGF β -30D, TGF β +MMF-7D, TGF β 3+MMF-30D.* Barras de escala: 30 μ m. Pg. 15

Figura 3 - Aspectos histológicos da distribuição de fibras elásticas e de proteoglicanos na túnica albugínea de ratos induzidos a DP e tratados com MMF. (A) Análise quantitativa de fibras elásticas (%). (B) Análise quantitativa de proteoglicanos totais na túnica albugínea (%). Os Gráficos apresentam médias $\pm$ SD, sendo que as diferentes letras (^{a, b, c}) apresentam as diferenças significativas entre os grupos experimentais, a partir da comparação entre os controles e grupos de mesmo tempo experimental (7 ou 30 dias). As comparações entre a frequência relativa (%) com mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais foram. Pg 17

demonstradas nas barras superiores, sendo as diferenças estatísticas demonstradas por asteriscos (***) $p < 0,005$). **(C)** As Figuras de cada um dos grupos mostram as colorações por resorcina-fucsina de Weigert para fibras elásticas e pela técnica do ferro coloidal para proteoglicanos. Barras de escala: 30 μm . Pg. 17

Figura 4 - Imunohistoquímica para diferentes tipos de metaloproteases de matrix (MMP-2, -3 e -9) na túnica albugínea de ratos induzidos a DP e tratados com MMF. **(A-C)** Análise quantitativa da expressão das MMPs -2, -9 e -3, respectivamente. Os Gráficos apresentam médias $\pm$ SD, sendo que as diferentes letras (a, b, c) apresentam as diferenças significativas entre os grupos experimentais a partir da comparação entre os controles e grupos de mesmo tempo experimental (sete ou 30 dias). As comparações entre a frequência relativa (%) com mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais foram demonstradas nas barras superiores, sendo as diferenças estatísticas demonstradas por asteriscos (***) $p < 0,005$. **(D)** Imagens representativas das imunohistoquímicas para as diferentes MMPs. As Figuras de cada um dos grupos mostram a marcação da reação imuno-histoquímica na túnica albugínea em marrom-acastanhado. *Grupos experimentais: Controle, Sham, TGF β 7D, TGF β 30D, TGF β +MMF7D, TGF β +MMF30D.* Barras de escala: 30 μm . Pg. 19

Figura 5 Análise da população de fibroblastos (vimentina+/ α -SMA-) e miofibroblastos (vimentina+/ α -SMA+) na túnica albugínea de ratos induzidos a DP e tratados com MMF. **(A-B)** Análise quantitativa da população de fibroblastos e miofibroblastos. Os Gráficos apresentam médias $\pm$ SD, sendo que as diferentes letras (a, b, c) apresentam as diferenças significativas entre os grupos experimentais, a partir da comparação entre os controles e grupos de mesmo tempo experimental (sete ou 30 dias). As comparações entre a frequência relativa (%) com mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais foram demonstradas nas barras superiores, sendo as diferenças estatísticas demonstradas por asteriscos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,005$). **(C)** Imagens ilustrativas da dupla marcação para vimentina (em rosa) e α -SMA (em marrom). As marcações foram analisadas para fibroblastos quando apenas a marcação foi para vimentina, enquanto para os miofibroblastos foram marcados por ambas as proteínas. Barras de escala: 20 μ m. Pg 21

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Dados biométricos dos grupos experimentais (Média SD).
Diferentes letras (a,b,c,d) indicam diferença estatística entre os
grupos experimentais. One way ANOVA. Pg. 14

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AINE	Anti-inflamatório não-esteroidal
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DD	doença de Dupuytren
DP	doença de Peyronie
El	elastina
Et al.	colaboradores
FA	fosfatase alcalina
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
IHQ	Imunohistoquímica
LECO	Litotripsia extracorpórea por ondas de choque
MEC	Matriz extracelular
MMF-7d	grupo que recebeu micofenolato mofetil após 7 dias
MMF-30d	grupo que recebeu micofenolato mofetil após 30 dias
MMF	micofenolato mofetil
MMP	metaloproteinase da matriz
p	probabilidade de significância
TA	túnica albugínea
TE	tecido erétil
TGF- β	fator transformante de crescimento beta

TIMP	inibidor tecidual de metaloproteinase
UNESP	Universidade Estadual Paulista
U	uretra peniana
Vs	vasos sanguíneos
α -SMA	α -actina de músculo liso
%	porcentagem
°	grau

RESUMO

Introdução: Doença de Peyronie é uma condição benigna caracterizada pela anormalidade peniana adquirida devido à fibrose da túnica albugínea, podendo apresentar dor peniana, distorção e deformação do pênis, assim como, prejuízo na atividade sexual do paciente. Sua etiologia, por não ser completamente compreendida, dificulta as estratégias para o tratamento. A falta de eficácia das drogas orais ou tratamento tópico justificam a realização de novos estudos afim de se estabelecer os mecanismos da doença e novos tratamentos. **Objetivo:** Avaliar as alterações nos elementos da matriz extracelular 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 26 ratos Wistar, machos adultos, pesando em média 381g, divididos em seis grupos. *Grupo Controle:* animais livres de manuseio experimental; *Grupo SHAM:* animais que receberam a injeção intrapeniana de soro fisiológico; *Grupo TGF- β 7D:* animais que receberam injeção intrapeniana de TGF- β para indução da DP e eutanasiados, após sete dias da indução; *Grupo TGF- β 30D:* animais que receberam injeção intrapeniana de TGF- β para indução da DP e eutanasiados após 30 dias da indução; *Grupo TGF- β + MMF 7D:* animais que receberam o tratamento com MMF durante 7 dias após a mesma indução com TGF- β e eutanasiados após este período; e *Grupo TGF- β + MMF 30D:* animais que receberam o tratamento com MMF, na mesma dose, durante 30 dias, após a indução com TGF- β e eutanasiados após este período. O processamento de cortes histológicos foi analisado em microscópio de luz convencional e também em sistema de fluorescência acoplado ao mesmo aparelho. As análises estereológicas foram realizadas para a obtenção do

volume relativo dos diferentes tipos de fibras conjuntivas da túnica albugínea peniana. Análise das Metaloproteinases da Matriz (MMP) e os elementos celulares do estroma foi realizada através da imunohistoquímica(IHQ) da túnica albugínea. As análises estatísticas foram realizadas, considerando $p < 0,05$ estatisticamente significante. Os dados paramétricos foram analisados por ANOVA unidirecional seguida de teste de Tukey e os dados não-paramétricos pelo método Kruskal-Wallis seguido por Teste de Dunn.

Resultados: Na avaliação histoquímica, evidenciou-se alteração na quantidade e razão dos colágenos III/I durante a indução da DP com retorno ao padrão inicial, após tratamento com MMF. As fibras elásticas estavam altamente remodeladas durante a indução da DP, mas o tratamento com MMF reduziu potencialmente os danos estruturais. Os Proteoglicanos foram remodelados na túnica albugínea, após a indução da DP. Na imunohistoquímica, as Metaloproteinases de matriz (MMPs) expressaram-se de forma diferente, após indução da DP e no tratamento com MMF e houve alteração na proporção de fibroblastos/miofibroblastos no tratamento com MMF. **Conclusões:** A injeção com TGF β foi capaz de gerar alterações fibróticas na matriz extracelular coincidentes com os achados da DP. O MMF atuou como agente antifibrótico remodelador dos elementos da matriz extracelular. Os resultados apontam fortemente para a efetiva participação dos proteoglicanos e ,principalmente, das MMPs no processo de gênese da doença e mitigação dos efeitos com o tratamento pelo MMF.

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

ABSTRACT

Introduction: Peyronie's disease is a benign condition characterized by an acquired penile abnormality due to fibrosis of the tunica albuginea, which may lead to penile pain, tortuosity and deformation of the penis, as well as impairment of the patient's sexual activity. Since its etiology is not fully understood, the treatment strategies are difficult. The lack of effectiveness of oral drugs or topical treatment encourages new trials to establish the mechanisms of the disease and new treatments. **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-six adult male Wistar rats, weighing on average 381 g., were divided into five groups. Group Control: animals free of experimental handling; Group *SHAM*: animals received an injection of saline solution 0,9%; Group *TGF- β 7D*: animals received an injection of TGF- β and euthanized after seven days of induction; Group *TGF- β 30D*: animals received an injection of TGF- β and euthanized after 30 days of induction; *Group TGF- β + MMF 7D*: animals treated with MMF for seven days after induction with TGF- β and euthanized after this period; *Group TGF- β + MMF 30D*: animals treated with MMF for 30 days after induction with TGF- β and euthanized after this period. The processing of histological sections was analyzed in a conventional light microscope and fluorescence system coupled with the same microscope. The stereological evaluation included the relative volume of different types of connective fibers of the penile tunica albuginea. Analysis of Matrix Metalloproteinases (MMP) and stromal cellular elements was performed by

immunohistochemistry (IHC) of the tunica albuginea. Statistical analyses were performed considering $p < 0.05$ statistically significant. Parametric data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test and non-parametric data by Kruskal-Wallis's method followed by Dunn's test. **Results:** In the histochemical evaluation, we found changes in the quantity and ratio of collagen III/I during PD induction with a return to the initial pattern after treatment with MMF. Elastic fibers were scattered during PD induction, but MMF treatment potentially reduced structural damage. Proteoglycans were remodeled in the tunica albuginea after PD induction. In the immunohistochemistry evaluation, matrix metalloproteinases (MMPs) were expressed differently after induction of PD and in treatment with MMF; there was a change in the proportion of fibroblasts/myofibroblasts after treatment with MMF. **Conclusions:** The induction of PD with TGF β was able to generate fibrotic changes in the extracellular matrix coinciding with the findings of PD. MMF acted as an antifibrotic agent, remodeling extracellular matrix elements. The results have shown us the effective participation of proteoglycans and especially MMPs in the disease genesis process and mitigation of the effects with MMF treatment.

Keywords: Peyronie's disease, TGF- β , Mycophenolate Mophetil, Matrix Metalloproteases.

Alterações na matriz extracelular em modelo animal da doença de Peyronie e os efeitos do tratamento pelo Micofenolato Mofetil.

1- INTRODUÇÃO

Doença de Peyronie (DP) foi primeiramente descrita, em 1743, pelo francês François Gigot de La Peyronie¹. É uma condição benigna caracterizada pela anormalidade peniana adquirida devido à fibrose da túnica albugínea². Além disso, pode apresentar dor peniana, distorção e deformação do pênis, assim como, prejuízo na atividade sexual do paciente³. A área mais comum afetada pela doença é a base do pênis seguida pela porção medial e distal⁴. Apresenta uma prevalência estimada entre 0,5% e 20,3%, embora haja uma preocupação de que possa estar subestimada, dada a sua natureza embaraçosa⁵.

A “placa” (cicatriz fibrótica) de Peyronie resulta de uma produção anormal da matriz extracelular através de uma regulação aumentada da atividade dos miofibroblastos e dos inibidores teciduais das metaloproteases da matriz, entre outros mecanismos⁶. Este tecido cicatricial, ou “placa”, acumula-se na túnica albugínea, podendo resultar em deformidades penianas, que podem ser, simples, múltiplas ou complexas podendo levar à curvatura peniana. As deformidades consistem também de chanfraduras penianas, afinamento do pênis, ou na forma de ampolheta. DP pode estar associada com disfunção erétil (DE) e/ou dor na ereção ou pênis flácido e pode ter um impacto negativo significativo no modo e na qualidade de vida do homem⁷.

DP é tipicamente caracterizada pelo início de um quadro agudo e uma fase crônica. A fase crônica é definida como duração dos sintomas maior do que 12 meses, e evidência

de doença estável na avaliação clínica⁸. A fase aguda dolorosa da DP dura geralmente entre cinco e sete meses, mas pode, raramente, continuar até 12 meses, de acordo com a história natural da doença. Após 18 meses do início da doença, 89% estarão livre da dor mesmo sem nenhum tratamento⁹. É fundamental distinguir estas duas fases, uma vez que a escolha do tratamento pode variar de acordo com os diferentes estágios dessa desordem. De fato, a formação da placa normalmente ocorre na fase aguda, enquanto durante a fase crônica, a dor comumente será reduzida e a curvatura peniana estabilizada¹⁰.

A distribuição de DP entre diferentes etnias é um dos fatores que sugerem uma base genética subjacente para a doença. Tem uma probabilidade maior de ocorrer em caucasianos, assim como, uma chance maior de aparecer em portadores da Doença de Dupuytren(DD). Quase 20% dos homens com DD apresentam DP. Esses fatos sugerem uma predisposição genética¹¹.

A etiologia da DP é multifatorial e não é completamente compreendida. A teoria mais prevalente de sua etiologia está relacionada ao trauma peniano, incluindo tanto eventos de trauma agudo quanto micro traumas repetitivos durante intercurso sexual, como evento desencadeante da DP. Múltiplos outros fatores de risco podem também predispor o desenvolvimento da DP: uretrite gonocócica, tabagismo, diabetes, uso de álcool, obesidade, hipertensão, dislipidemia, baixos níveis de testosterona e cirurgia pélvica^{12,13}.

Perturbações na cicatrização normal levam à fibrose associada à DP. Embora muitas vezes se pense que um gatilho traumático ou inflamatório inicie a DP; os pacientes raramente se recordam de tais eventos. Enquanto uma cicatrização normal, após evento desencadeante leva à reorganização da matriz extracelular no reparo tecidual, um desequilíbrio na fibrose e fibrinólise podem resultar na formação da placa fibrótica¹⁴.

Durante o desenvolvimento da DP, há um aumento na secreção de fator de crescimento transformador- β (TGF- β) pelo distúrbio na túnica albugínea levando à desorganização dos elementos da matriz extracelular (MEC). O TGF- β é um fator chave para ativação de miofibroblastos e um fator importante na fibrose em todos os órgãos. Os miofibroblastos são um elemento crucial para o processo fibrótico, pois causam acúmulo excessivo de fibras de colágeno, fibronectina e outros componentes da matriz extracelular (MEC).

Uma classe de proteínas, da família das endopeptidases, responsáveis pela degradação da MEC são as metaloproteases de matriz extracelular (MMPs). Apresentam papel importante no processo de remodelamento durante a cicatrização¹⁶. As MMPs têm sido frequentemente associadas à fibrose. Um desequilíbrio entre as MMPs, que remove as fibras de colágeno, e seu inibidor tecidual de metaloproteases (TIMP) em miofibroblastos, juntamente com a diminuição de apoptose, são considerados fatores-chave no desenvolvimento de doenças fibróticas^{17,18}.

Doenças fibróticas apresentam um espectro variado de desordens, sendo caracterizadas por um acúmulo desproporcional dos elementos da MEC como os colágenos tipo I e III. Nas fases iniciais da cicatrização os miofibroblastos depositam colágeno tipo III. Tecidos fibróticos estão associados com uma razão colágeno III/I em direção a um aumento na quantidade de colágeno III¹⁹. Observa-se desequilíbrio entre a proporção de colágenos I e III, com inversão na predominância de ambos, nas fases iniciais da doença, e posteriormente a formação de placas calcificadas^{19,20,21}. Assim, a túnica albugínea adquire uma propriedade inelástica, perdendo sua elasticidade durante a ereção²². Esta propriedade está relacionada com a perda das fibras elásticas e remodelação do conteúdo de proteoglicanos, o que também leva a um prejuízo durante a ereção peniana^{20,21,23}.

Os elementos da MEC respondem à secreção de TGF- β pelos elementos celulares levando à transformação de fibroblastos em miofibroblastos. Essa diferenciação é avaliada através da expressão da alfa-actina músculo liso(α -SMA)^{24,25,26}. Os fibroblastos são responsáveis pela síntese de MEC em condições normais, e são diferenciados em miofibroblastos após algum dano. Aparentemente, a transição fibroblasto-miofibroblasto ocorre sob deficiência de elastina na MEC, promovendo uma ruptura em sua integridade e induzindo a diferenciação em alta taxa de síntese fibrilar^{26,27}.

O diagnóstico da DP envolve uma história clínica detalhada, exame físico com palpação peniana, documentação fotográfica da curvatura, e ultrassom Doppler dinâmico do pênis, assim como tomografia computadorizada e ressonância magnética em alguns casos. Além disso, recentemente tem sido proposto a elastografia como uma ferramenta diagnóstica^{28,29}. Recomenda-se realizar uma injeção intracavernosa com ou sem o ultrassom doppler previamente à alguma intervenção invasiva²⁹. Exames laboratoriais não são necessários para o diagnóstico de DP¹³.

O tratamento da DP pode ser dividido em tratamento conservador, que deve ser realizado na fase ativa ou aguda da doença, e tratamento cirúrgico que é indicado para pacientes na fase crônica³⁰. Atualmente o tratamento conservador inclui: medicamentos orais, tópicos, injeções intralesionais de agentes ativos, e dispositivos médicos locais, como litotripsia extracorpórea por ondas de choque (LECO), tração peniana e dispositivos a vácuo. As terapias orais não apresentaram evidência consistente até o momento, não sendo recomendadas para uso clínico. O único tratamento medicamentoso aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA), na fase estável da DP é a injeção intralesional com Collagenase clostridium histolyticum (CCH)^{30,31}.

É importante ressaltar que atualmente, a única opção de tratamento recomendada para a fase aguda da DP são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que visam tratar a dor associada com a doença³².

A correção cirúrgica deve ser realizada em pacientes, após 12 meses de sintomas e que apresentem uma curvatura peniana acentuada com prejuízo na função sexual. O objetivo da cirurgia é corrigir a curvatura e permitir a penetração durante a relação sexual. Outros fatores que indicam tratamento cirúrgico são: placas ou calcificações penianas extensas, falha do tratamento clínico ou desejo do paciente³⁰.

Entre as terapias aplicadas para reduzir a DP, algumas drogas relacionadas com o processo fibrótico têm sido usadas. Algumas collagenases e até inibidores da fosfodiesterase tipo 5 foram utilizadas em modelos in vivo e in vitro para tratar DP^{33,34,35}. Estes métodos envolvem duas importantes vias de tratamento para combater os efeitos do remodelamento estromal. A primeira está relacionada com a degradação dos elementos fibrilares da matriz, os quais são naturalmente fornecidos pelas MMPs e remodelam fibras colágenas, fibras elásticas e proteoglicanos³⁶. O segundo mecanismo é referente ao mecanismo de diferenciação dos elementos celulares em fenótipos capazes de alta síntese da matriz²⁷. Em geral, drogas com potencial anti-fibrótico podem evidenciar resultados relevantes em relação à DP³⁷.

Micofenolato Mofetil (MMF) apresenta propriedades imunossupressoras e um perfil de segurança favorável sendo recomendado no tratamento de algumas doenças autoimunes³⁸. Utilizado primariamente como imunossupressor em transplante de órgãos, MMF já demonstrou previamente reduzir a síntese de colágeno e atividade fibroblástica com algum sucesso no tratamento da fibrose retroperitoneal³⁹. Estudo pré-clínico prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, em roedores, já evidenciou um efeito anti-fibrótico

na DP induzida com TGF- β ²³. Além disso, modelos animais roedores têm sido amplamente utilizados para estudo da recuperação da função erétil, redução da fibrose e como teste de novas drogas para reabilitação peniana²³.

Devido à falta de consenso sobre a eficácia dos medicamentos utilizados no tratamento da DP; esse estudo com uso de MMF, após indução com TGF- β é justificado uma vez que se apresenta como uma possível opção terapêutica. Uma avaliação nas alterações dos elementos da MEC, após uso do MMF poderá fornecer mais evidência de sua eficácia. Além disso, seu prévio uso em outras doenças e sua segurança já comprovada no uso em humanos facilitará o uso para estudos em DP.

Deste modo, este estudo objetiva avaliar as alterações na MEC, após indução de DP com TGF- β em modelo animal e os efeitos da administração de MMF na remodelação tecidual, após esta indução.

1.1- Objetivo

Avaliar, ao nível arquitetural, celular e por imuno-histoquímica, as alterações microscópicas na matriz extracelular da túnica albugínea de pênis de ratos, após indução da Doença de Peyronie com TGF- β e posterior tratamento pelo Micofenolato Mofetil (MMF).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados machos adultos de ratos Wistar (N=26), pesando em média 381g, adquiridos da ANILAB (ANIMAIS PARA PESQUISA CRIAÇÃO E COMERCIO LTDA), sediada em Paulínia-SP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração peletizada (Labina)[®], água *ad libitum*, controle da temperatura (24°C) e luminosidade durante todo o período experimental no Centro de alimentação animal do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP). Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FAMERP (Anexo 1), protocolo CEUA no. 001-003819/2019.

Os animais foram divididos em cinco grupos (Figura 1): *Grupo Controle*: animais livres de manuseio experimental; *Grupo SHAM*: animais que receberam a injeção intrapeniana de 0,1 ml de soro fisiológico 0,9%; *Grupo TGF- β 7D*: animais que receberam injeção intrapeniana de TGF- β para indução da DP e eutanasiados após sete dias da indução; *Grupo TGF- β 30D*: animais que receberam injeção intrapeniana de TGF- β para indução da DP e eutanasiados, após 30 dias da indução; *Grupo TGF- β + MMF 7D*: animais que receberam o tratamento com MMF durante sete dias, após a mesma indução com TGF- β e eutanasiados, após este período; e *Grupo TGF- β + MMF 30D*: animais que receberam o tratamento com MMF, na mesma dose, durante 30 dias, após a indução com TGF- β e eutanasiados após este período. Todos os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal da mistura de ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg)⁽⁴⁰⁾.

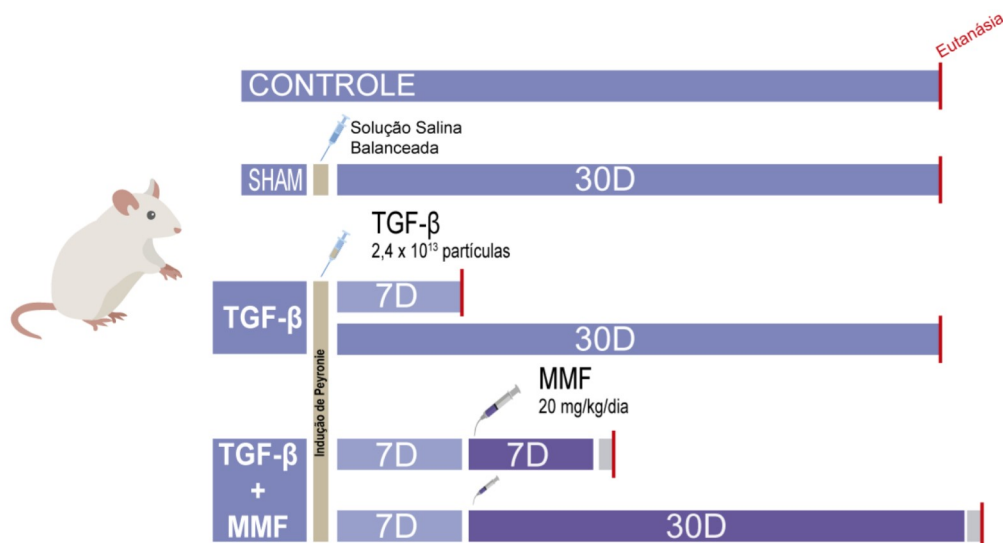


Figura 1 Delineamento Experimental. O desenho experimental apresenta quatro grupos principais - controle, SHAM, TGF-β e TGF-β + MMF - sendo divididos os últimos em subgrupos de sete e 30 dias após indução e tratamento.

2.2 Métodos

2.2.1 Indução da Doença de Peyronie (DP)

A indução da DP em ratos baseou-se em estudos prévios de Hellstrom et al. ⁽⁴¹⁾ e Antoniassi et al. ⁽²³⁾ Os ratos foram fixados pelos membros superiores e inferiores, em decúbito dorsal, a uma mesa cirúrgica após a pesagem e anestesia com isoflurano 3%. Nos grupos 3, 4 e 5 foram submetidos à indução da DP por meio de injeções na túnica albugínea repetidas de TGF-β (*Sigma-Aldrich*) nos dias 0, 3º e 6º ao longo de todo o pênis bilateralmente. Foram injetadas $2,4 \times 10^{13}$ partículas de TGF-β em cada rato após a anestesia. Os animais foram mantidos em recuperação, após o procedimento com dieta normossódica, normoprotéica e água *ad libitum*. Os animais dos grupos de indução foram eutanasiados em dois tempos para o acompanhamento da evolução da DP e observação do remodelamento dos elementos estromais, sendo coletadas as amostras após sete dias (*Grupo TGF-β 7D*) e 30 dias (*Grupo TGF-β 30D*) após a indução. O *Grupo SHAM* foi

submetido ao mesmo procedimento de relatado para indução da DP, porém foi injetado soro fisiológico 0,9%, para simular as injeções dos grupos de indução.

2.2.2 – Tratamento com Micofenolato Mofetil (MMF)

Os ratos dos *Grupos TGF- β + MMF 7D* e *TGF- β + MMF 30D* receberam, após a indução do processo fibrótico peniano com TGF- β , a droga MMF (20mg/kg). O *Grupo TGF- β + MMF 7D* recebeu durante sete dias consecutivos e o *Grupo TGF- β + MMF 30D* durante 30 dias consecutivos. Essa dosagem foi baseada na dose segura recomendada na bula do medicamento e utilizada em estudo prévio com o mesmo modelo animal ⁽²³⁾. Após a última dose de MMF, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia com dose excessiva de tiopental, de acordo com padronizado pela American Veterinary Medical Association⁽⁴²⁾, para retirada do pênis, a fim de realizar estudos histológicos.

2.2.3 Processamento histológico e análise Histoquímica

Após remoção peniana, as peças foram fixadas em solução tamponada de paraformaldeído 4% e processadas no sistema semifechado Leica (TP1020, Leica Biosystems). Todo o processamento histológico e análise histoquímica foram realizados no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

As peças penianas, devidamente lavadas em água destilada, foram desidratadas em etanol, clarificadas em xilol e, então, incluídas em Paraplast (Sigma) de maneira a obter-se cortes transversais das peças penianas. Assim, foram seccionadas em micrótomo rotativo automático Leica, entre 4,5 μ m e coradas pelas seguintes técnicas tintoriais:

1. Coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE): para estudos morfológicos e histopatológicos gerais do órgão⁽⁴³⁾;
2. Coloração pela Hematoxilina-Eosina, analisada em microscopia de fluorescência, para avaliação das fibras elásticas baseadas em metodologia descrita por de Carvalho e Taboga⁽⁴⁴⁾;
3. Coloração pela Reticulina de Gömöri: para estudo das fibras reticulares e colágenas⁽⁴³⁾;
4. Coloração de Picrossirius: para estudo do colágeno I, sendo sua agregação avaliada na microscopia polarizada⁽⁴³⁾;
5. Ferro coloidal: para avaliação e detecção de proteoglicanos de baixo e alto peso ⁽⁴³⁾;
6. Resorcina de Weigert: para avaliação de fibras elásticas ⁽⁴³⁾.

2.2.4 Análise histológica e histoquímica

Os cortes histológicos foram analisados no microscópio de luz convencional Olympus BX60 e em sistema de fluorescência acoplado ao mesmo aparelho. Imagens microscópicas foram obtidas para as devidas análises morfológicas e estereológicas.

2.2.5 Análise estereológica

As análises estereológicas foram realizadas para a obtenção do volume relativo dos diferentes tipos de fibras conjuntivas da túnica albugínea peniana. Para isso, foram capturados 20 campos aleatórios de cada subgrupo a partir de lâminas nas diferentes técnicas histoquímicas, através do Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc., Washington DC). As medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 proposto por

Weibel.⁽²⁹⁾ Assim, a partir dos dados obtidos para cada campo analisado, foi calculada a frequência relativa dos componentes fibrilares.

2.2.6 Análise Imunohistoquímica

Análise da Metaloproteinases da Matriz (MMP) e os elementos celulares do estroma foi realizada através da imuno-histoquímica (IHQ) da túnica albugínea. Os cortes foram submetidos à reidratação e desparafinação. A recuperação dos antígenos foi realizada com solução tampão de citrato 10mM(pH6) ou EDTA Tris (pH9) a 95°C. Posteriormente, para bloqueio da peroxidase endógena foram utilizados 10% de H₂O₂ em metanol. Proteínas inespecíficas foram bloqueadas com leite desnatado 5% por 1 hora. A incubação de anticorpos primários foi realizada durante a noite usando as seguintes diluições: MMP2 (monoclonal de camundongo, 8B4, 1:50, sc-13595, Santa Cruz Biotechnology), MMP3 (coelho policlonal, PA5-27936, 1:100, Invitrogen, ThermoFisher), MMP9 (monoclonal de camundongo, 2C3, 1:100, sc-21733, Biotecnologia Santa Cruz), α -actina de músculo liso (α -SMA) (monoclonal de camundongo, 1A4, 1:100, sc-32251, Biotecnologia Santa Cruz), e vimentina (monoclonal de camundongo, V9, 1:100, sc-6260, Santa Cruz Biotechnology). Para MMPs, a coloração positiva foi detectada pela reação do cromogênio DAB (tetracloridrato de 3-30'-diaminobenzidina, Novolink™ DAB, RE7270-CE, Leica Biosystems, Buffalo 121 Grove, EUA) sendo contrastado com hematoxilina. Para imuno-histoquímica dupla de α -SMA e vimentina, a detecção foi realizada por MACH 2 Double Stain 2 (Multiplex IHC Detection™, BioCare) e detectada com fosfatase alcalina (FA) e cromogênio DAB. As análises de expressão de MMP foram realizadas através da seleção aleatória de 20 campos da túnica albugínea por animal (ampliação de 200x) e foram expressas como porcentagem

da área positiva total. Para contagem de fibroblastos (vimentina+ α -SMA-) e miofibroblastos (vimentina+ α -SMA+) em dupla imunohistoquímica, o software QuPath foi utilizado para detectar imunocolorações. Para essas análises foi considerada toda a circunferência da túnica albugínea por corte/animal e expressa como percentual de células positivas para as marcações.

2.2.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas considerando $p < 0,05$ estatisticamente significante. Dados de colágenos, fibras elásticas e proteoglicanos (dados paramétricos), bem como MMPs e elementos celulares (dados não paramétricos), foram analisados por ANOVA unidirecional seguida de teste de Tukey (dados paramétricos), ou Kruskal-Wallis seguido por Teste de Dunn (dados não paramétricos). Comparações estatísticas foram realizadas entre controle, SHAM e PD com ou sem MMF (sete ou 30 dias separadamente) e expressas em gráficos por letras (a, b, c) para diferenciar a significância estatística entre os grupos. As comparações entre sete e 30 dias de indução da DP com ou sem tratamento com MMF foram realizadas pelo teste *T* de Student, e as diferenças estatísticas foram expressas em Gráficos pela barra superior com asteriscos.

3. RESULTADOS

Os dados biométricos foram plotados na Tabela 1. Foram observadas diminuições significativas do peso do pênis (g) e peso relativo (%) do grupo TGFβ 7D em comparação ao controle, mas sem diferença estatística com os outros grupos experimentais.

Tabela 1. Dados biométricos dos grupos experimentais (Média ± SD). Diferentes letras (a,b,c,d) indicam diferença estatística entre os grupos experimentais. One-Way ANOVA.

	<u>Controle</u>	SHAM	TGFβ 7D	TGFβ 30D	TGFβ + MMF 7D	TGFβ + MMF 30D
Peso Corporal (g)	413,5 ± 15,61	442,5 ± 19,42	412,0 ± 9,23	395,0 ± 28,87	420,0 ± 12,66	417,3 ± 21,53
Peso do Pênis (g)	0,321 ± 0,007 ^{bc}	0,308 ± 0,022 ^{cd}	0,258 ± 0,008 ^{ad}	0,291 ± 0,009 ^{cd}	0,301 ± 0,029 ^{cd}	0,280 ± 0,019 ^{cd}
Peso Relativo (%)	0,077 ± 0,003 ^{bc}	0,069 ± 0,006 ^{cd}	0,062 ± 0,005 ^{ad}	0,067 ± 0,002 ^{cd}	0,071 ± 0,006 ^{cd}	0,067 ± 0,005 ^{cd}

3.1 A indução da DP altera os tipos de colágeno na túnica albugínea, enquanto o tratamento com MMF restaura o padrão principal

O conteúdo de colágeno foi avaliado através da coloração Picrosirius para o colágeno total, e o colágeno tipo I sob microscopia polarizada. Reticulina de Gomori com impregnação de prata foi utilizada para avaliar o colágeno tipo III (Figura 2A). Um desequilíbrio entre os dois tipos de colágeno foi observado em comparação com 7 e 30 dias após a indução da DP por TGF β (Figura 2C). A prevalência do colágeno tipo I foi observada nos grupos controle e SHAM, apresentando discreta diferença estatística quando comparado ao colágeno tipo I do mesmo grupo (Figura 2A, C). O tratamento com MMF por sete dias não promoveu alteração na frequência relativa de ambos os tipos de colágeno, enquanto após 30 dias de tratamento com MMF, ambos os tipos de colágeno foram reduzidos, com valores significativos em comparação com o grupo de apenas indução aos 30 dias.

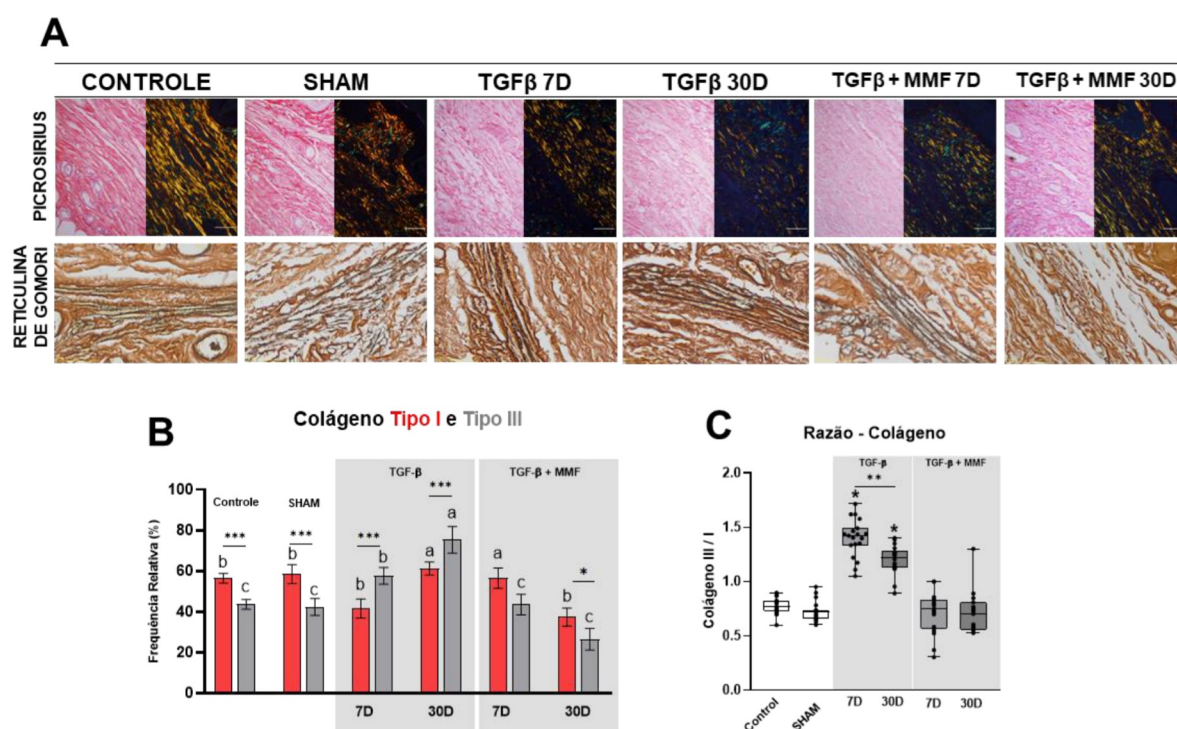


Figura 2. Aspectos histológicos dos elementos fibrilares da túnica albugínea de ratos induzidos a DP e tratados com MMF. **(A)** Fibras colágenas do tipo I e III. As figuras de cada um dos grupos mostram as colorações por picrossírius em luz convencional e polarizada e pela técnica de reticulina de Gomori, revelando os colágenos I e III, respectivamente. **(B e C)** Análise quantitativa da distribuição dos elementos fibrilares colagênicos na túnica albugínea. Os gráficos apresentam médias $\pm$ SD do quantitativo de colágeno I (vermelho) e colágeno III (cinza) nos diferentes grupos. Diferentes letras (^a, ^b, ^c) demonstram diferença significativa entre os grupos experimentais, sendo as comparações realizadas separadamente entre colágeno tipo I (barras vermelhas) e colágeno tipo III (barras em cinza). As comparações entre a frequência relativa (%) dos tipos de colágeno foram demonstradas nas barras superiores, sendo as diferenças estatísticas demonstradas por asteriscos (***) $p < 0,005$). **(C)** Razão entre colágeno III e I. O gráfico apresenta os dados em box plot (mediana; quartis 25/75%) relacionados à distribuição das médias dos indivíduos de cada grupo experimental (pontos). A comparação estatística foi demonstrada pelas barras superiores e asteriscos (**) $p < 0,01$ e as comparações entre grupos com mesmo tempo de tratamento (7 ou 30 dias) foi expresso com (*) no grupo que apresentou maior valor de média e diferença significativa. *Grupos experimentais:* Controle, Sham, TGFβ-7D, TGFβ-30D, TGFβ+MMF-7D, TGFβ+MMF-30D. Barras de escala: 30 μ m.

Comparando a razão entre os tipos de colágeno (colágeno III/colágeno I), foram observados altos valores no grupo DP com 7 dias (1.4 ± 0.04) e 30 dias (1.2 ± 0.031) após indução da DP (Figura 2C). Em contraste, PD mais o tratamento com MMF por sete (0.71 ± 0.047) e 30 dias (0.72 ± 0.051) promoveu redução na razão do colágeno, similar aos grupos controle (0.77 ± 0.016) e SHAM (0.72 ± 0.02). Na microscopia polarizada, a

agregação do colágeno tipo I foi perdida na túnica albugínea dos grupos PD (7 e 30 dias), demonstrada pelas áreas avermelhadas não-polarizadas, enquanto nos grupos MMF essa condição foi recuperada (Figura 2A)

3.2 As fibras elásticas estavam altamente remodeladas durante a indução da DP, mas o tratamento com MMF reduziu potencialmente os danos estruturais.

A quantidade de fibras elásticas, após a indução da DP foi expressa em porcentagem da frequência relativa (Figura 3A, C). A indução da DP com sete dias não promoveu alterações na frequência das fibras elásticas da túnica albugínea, enquanto com 30 dias estas fibras estavam quase 10 vezes aumentadas, quase 10 vezes (Figura 3A). Além disso, as fibras elásticas apresentaram-se com uma distribuição difusa na túnica albugínea da DP no grupo 30 dias, enquanto no grupo controle apresentaram-se contínuas e no grupo SHAM foi observada elastina fragmentada em forma de ponto (Figura 3C). O tratamento com MMF não apresentou diferenças estatísticas na comparação entre indução de DP aos sete e 30 dias. Porém, após sete dias de tratamento com MMF, a redução da frequência das fibras elásticas não foi significativa em comparação ao grupo controle. Fibras elásticas contínuas e reorganizadas foram observadas no grupo MMF com 30 dias entre estruturas de elastina fragmentadas na túnica albugínea. A disposição das fibras elásticas com sete dias TGF β e o tratamento com MMF, diferiu apenas pela presença de fibras normais e contínuas (Figura 3C).

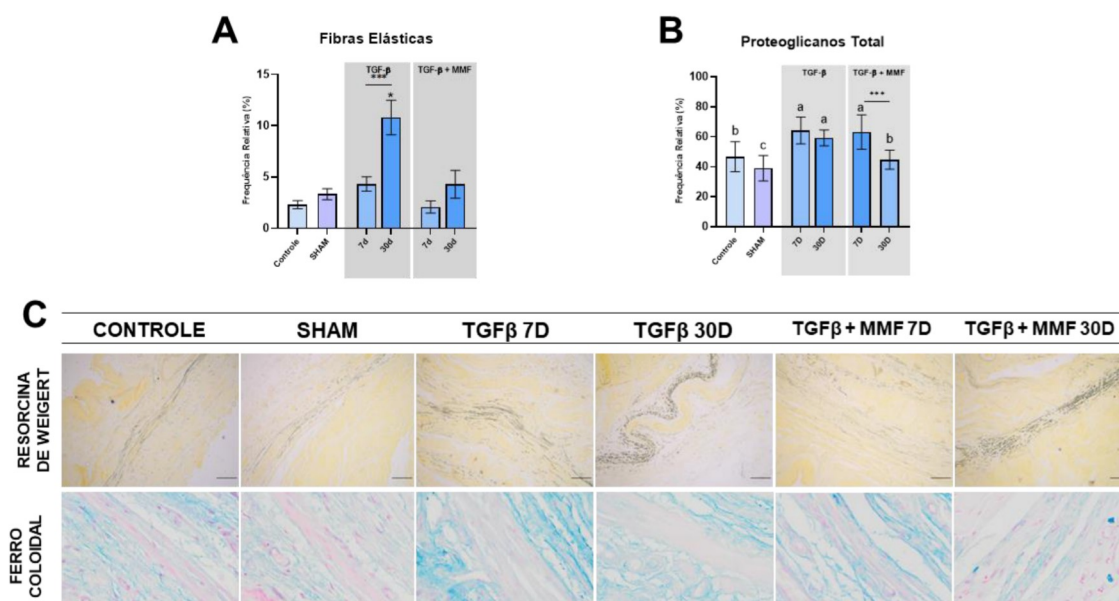


Figura 3. Aspectos histológicos da distribuição de fibras elásticas e de proteoglicanos na túnica albugínea de ratos induzidos a DP e tratados com MMF. **(A)** Análise quantitativa de fibras elásticas (%). **(B)** Análise quantitativa de proteoglicanos totais na túnica albugínea (%). Os gráficos apresentam médias $\pm$ SD, sendo que as diferentes letras (a, b, c) apresentam as diferenças significativas entre os grupos experimentais a partir da comparação entre os controles e grupos de mesmo tempo experimental (7 ou 30 dias). As comparações entre a frequência relativa (%) com mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais foram demonstradas nas barras superiores, sendo as diferenças estatísticas demonstradas por asteriscos (***) $p < 0,005$. **(C)** As figuras de cada um dos grupos mostram as colorações por resorcina-fucsina de Weigert para fibras elásticas e pela técnica do ferro coloidal para proteoglicanos. Barras de escala: 30 μ m.

3.3 Proteoglicanos foram remodelados na túnica albugínea após a indução da DP.

O total de proteoglicanos foi composto pela porcentagem da área da túnica albugínea corada pela técnica do Ferro Coloidal (Figura 3B, C). A indução da DP promoveu aumento com sete e 30 dias após a injeção de TGF β , sem diferenças entre eles (Figura 3B). Ambos os períodos apresentaram valores aumentados em relação aos grupos controle e SHAM. Porém, o tratamento com MMF apresentou alterações no total de proteoglicanos na túnica albugínea (Figura 3B). Após sete dias de tratamento com MMF, a frequência de proteoglicanos estava aumentada, em comparação ao controle e SHAM, enquanto após 30 dias, os proteoglicanos totais diminuíram, com valores significativos em comparação com sete dias de indução de DP (Figura 3B).

3.4 As Metaloproteinases de matriz (MMPs) expressaram-se de forma diferente, após indução da DP e tratamento com MMF.

O remodelamento da MEC pelas MMPs foi avaliado com foco na expressão das collagenases MMP-2 (Figura 4A) e MMP-9 (Figura 4B) e na expressão da estromelisina MMP-3 (Figura 4C) na túnica albugínea dos grupos experimentais. a expressão da MMP2 e MMP9 estavam notadamente aumentadas após 7 dias de experimento com ou sem tratamento com MMF (Figura 4D). Com 30 dias, todos os grupos apresentaram uma diminuição na expressão das MMPs, em comparação com sete dias. Porém o tratamento com MMF apresentou um aumento nos valores da porcentagem de expressão do MMP2 quando comparado com amostras de 30 dias de indução com TGF β . Expressão de MMP-3 estava aumentada após sete dias de indução com TGF β , enquanto o tratamento com MMF não alterou sua expressão. Com 30 dias de tratamento com MMF, MMP3 apresentou um aumento em comparação com todos os grupos experimentais (Figura 4C). A expressão de todas as MMPs apresentava-se difusa na MEC, assim como nas células de músculo liso da túnica albugínea (Figure 4D).

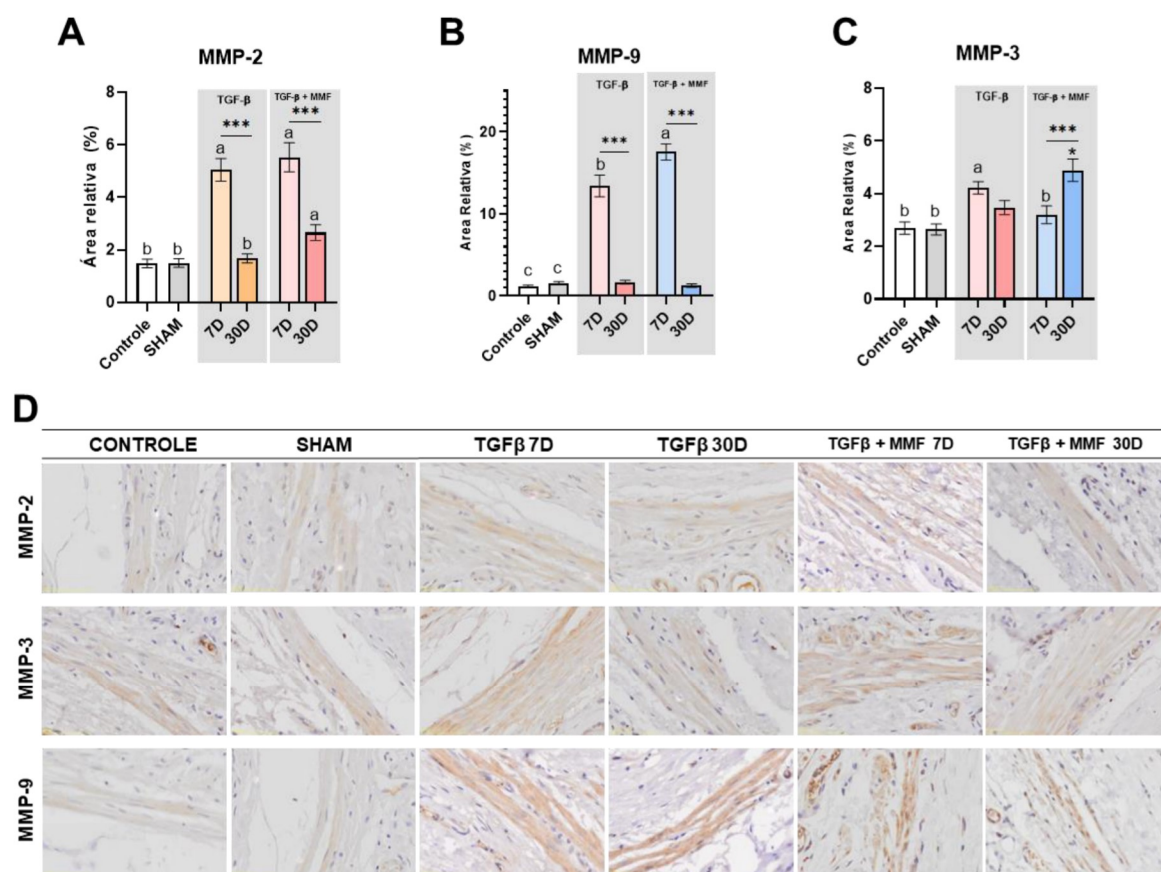


Figura 4. Imunohistoquímica para diferentes tipos de metaloproteases de matrix (MMP-2, -3 e -9) na túnica albugínea de ratos induzidos a DP e tratados com MMF. **(A-C)** Análise quantitativa da expressão das MMPs -2, -9 e -3, respectivamente. Os gráficos apresentam médias $\pm$ SD, sendo que as diferentes letras (a, b, c) apresentam as diferenças significativas entre os grupos experimentais a partir da comparação entre os controles e grupos de mesmo tempo experimental (sete ou 30 dias). As comparações entre a frequência relativa (%) com mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais foram demonstradas nas barras superiores, sendo as diferenças estatísticas demonstradas por asteriscos (***) $p < 0,005$). **(D)** Imagens representativas das imunohistoquímicas para as diferentes MMPs. As figuras de cada um dos grupos mostram a marcação da reação imuno-histoquímica na túnica albugínea em marrom-acastanhado. Grupos experimentais: Controle, Sham, TGFβ7D, TGFβ30D, TGFβ+MMF7D, TGFβ+MMF30D. Barras de escala: 30 μ m.

3.5 A proporção de fibroblastos/miofibroblastos alterou-se com tratamento com MMF.

Pela técnica da imunohistoquímica-dupla, avaliou-se a população de fibroblasto (vimentina+ α -SMA-) e miofibroblasto (vimentina+ α -SMA+) na túnica albugínea dos animais (Figura 5 A-C). Os fibroblastos normais estavam prevalentes nos grupos controle e SHAM devido ao baixo dano na túnica albugínea (Figura 5A). Também, com sete dias após indução da DP, os fibroblastos apresentavam-se como grupo controle. Tratamento com MMF por sete dias diminuiu a quantidade total de fibroblastos na região da túnica albugínea quando comparado com todos os outros grupos. Com 30 dias, tanto na indução com TGF β quanto no tratamento com MMF, a população de fibroblastos apresentou uma porcentagem similar entre estes grupos (Figura 5A).

Com relação aos miofibroblastos (Figura 5B), nos grupos controle e SHAM, e também após sete dias da indução com TGF β , esse tipo celular apresentou-se escasso perto ou dentro da túnica albugínea. Foi observado um aumento drástico no tratamento com MMF por sete dias, sem diferenças em comparação aos 30 dias de tratamento com MMF.

Indução com TGF β promoveu um aumento na população de miofibroblasto quando comparados após sete e 30 dias.

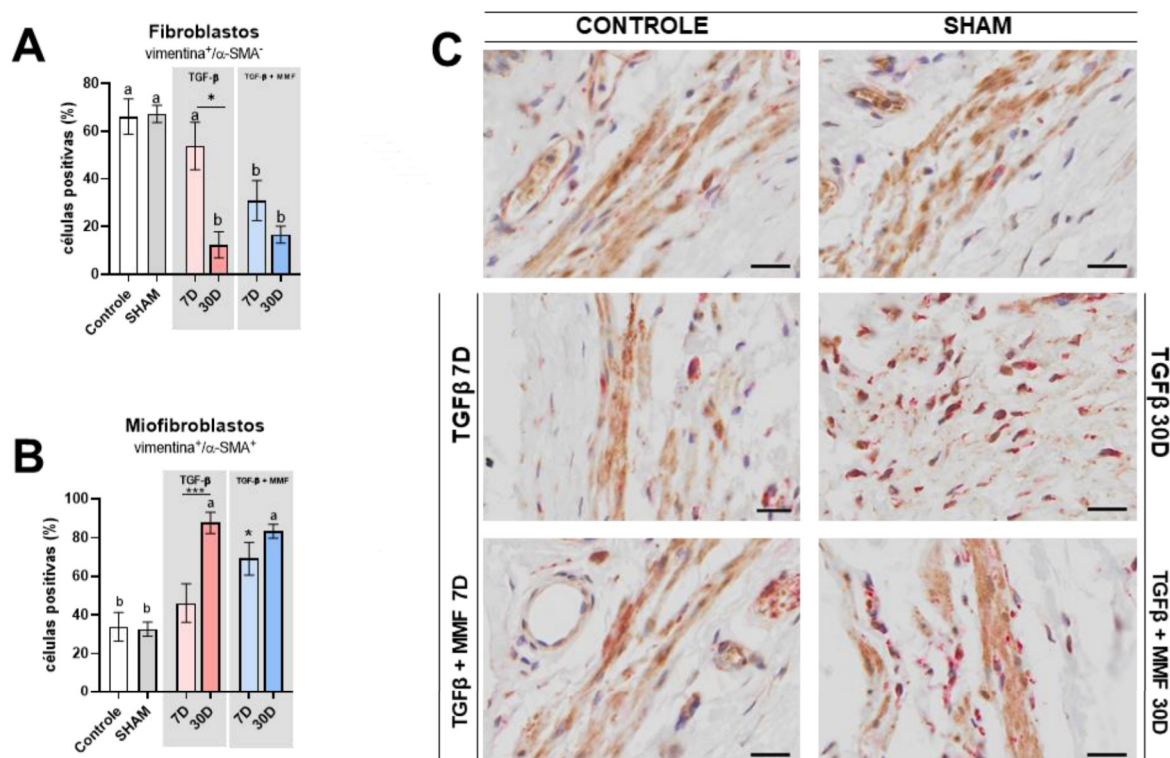


Figura 5. Análise da população de fibroblastos (vimentina⁺/α-SMA⁻) e miofibroblastos (vimentina⁺/α-SMA⁺) na túnica albugínea de ratos induzidos a DP e tratados com MMF. **(A-B)** Análise quantitativa da população de fibroblastos e miofibroblastos. Os gráficos apresentam médias ± SD, sendo que as diferentes letras (a, b, c) apresentam as diferenças significativas entre os grupos experimentais a partir da comparação entre os controles e grupos de mesmo tempo experimental (sete ou 30 dias). As comparações entre a frequência relativa (%) com mesmo tratamento em diferentes tempos experimentais foram demonstradas nas barras superiores, sendo as diferenças estatísticas demonstradas por asteriscos (* p<0,05; *** p<0,005). **(C)** Imagens ilustrativas da dupla marcação para vimentina (em rosa) e α-SMA (em marrom). As marcações foram analisadas para fibroblastos quando apenas a marcação foi para vimentina, enquanto para os miofibroblastos foram marcados por ambas as proteínas. Barras de escala: 20 μm.

4. DISCUSSÃO

Esse estudo demonstrou o remodelamento dos componentes da MEC durante o desenvolvimento da DP com indução pelo TGF β , e como MMF atua como tratamento anti-fibrótico, mitigando as principais alterações nos colágenos e na expressão de MMP. O emprego de drogas anti-fibróticas, como o MMF, poderia reverter a progressão da DP devido ao mecanismo de remodelamento da matriz. Nossos resultados evidenciaram que o MMF atuou através de dois principais mecanismos para prevenir o desenvolvimento da DP: (1) diminuição da quantidade de colágeno III em relação ao colágeno I; e (2) remodelamento de componentes associados da MEC para evitar danos à túnica albugínea. Ambos os mecanismos envolvem a expressão de MMP, células do tipo fibroblásticas, e componentes fibrilares da MEC, como o colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos.

Colágenos são os importantes componentes fibrilares alterados durante as fases da DP ⁽²¹⁾. O desequilíbrio na relação dos colágenos tipo I e III permite um distúrbio fibrótico no pênis devido à deposição e disposição desordenadas ⁽⁴⁵⁾. Nosso estudo prévio demonstrou que o TGF β promoveu essa alteração na túnica albugínea de ratos Wistar ⁽²³⁾. Nossos resultados neste presente estudo demonstraram que a discrepância entre sete e 30 dias foi significativa para promover a DP. O tratamento com MMF promoveu o efeito oposto também. A razão Colágeno III/I no grupo TGF β foi positiva para deposição de colágeno III, potencializando esta discrepância já observada aos sete dias e confirmada com 30 dias. Esse desequilíbrio é importante para a progressão da DP devido à excessiva presença de colágeno para a formação da placa em estágios avançados ^(21,27). Porém, o tratamento com MMF não alterou a razão colágeno III/I com sete dias após indução com TGF β , o que provavelmente foi relevante para promover um efeito positivo e a

recuperação do colágeno I na túnica albugínea, assim como observado nos grupos controle e SHAM.

Desse modo, para o desenvolvimento da DP, a agregação do colágeno I é importante para a formação tardia da placa fibrótica^(6,21). Primeiro, o colágeno III molda uma estrutura para a deposição de colágeno I e formação da placa, levando à disfunção erétil^(21,22). O MMF diminui a deposição de colágeno no desenvolvimento fibrótico do rim lesionado e na função plaquetária^(46,47). Assim, a desorganização do colágeno I promovida pela DP é recuperada através do tratamento com MMF por sete dias e acentuada com 30 dias. O colágeno não-polarizado na túnica albugínea de ratos induzidos para DP está associado à deposição de colágeno III durante o desenvolvimento inicial da doença⁽²³⁾. Nossos resultados nos permitiram, também, compreender que o ponto crítico de sete dias após indução da DP é relevante para considerar o tratamento, uma vez que a razão colágena III/I após indução da DP estava estabelecida e potencializada para a progressão da doença.

Outros elementos da MEC contribuem para o desenvolvimento da DP e surgem como mecanismo do MMF para promover a sua recuperação. As fibras elásticas auxiliam no processo de alongamento da túnica albugínea durante a ereção peniana. As fibras elásticas são compostas de glicoproteína fibrilar e grupos de fibrilas, os quais ocupam espaços extracelulares que estão cheios de elastina. Esse sistema permite o alongamento e aumento da rigidez peniana durante a ereção, assim como o rápido retorno ao estado flácido após a detumescência⁽⁴⁸⁾. Uma alteração na integridade dessas fibras, e a elastose, podem levar a um mau funcionamento peniano durante a ereção. O desenvolvimento da DP promove comumente uma desordem nas fibras elásticas e sua prevalência da túnica albugínea^(20,22). Nosso estudo observou uma redução das fibras elásticas com sete dias

após indução com TGF β , porém com 30 dias a porcentagem destas fibras aumentou drasticamente. As principais diferenças observadas entre ambos os grupos, indução com TGF β e tratamento com MMF, foram o arranjo das fibras elásticas e a distribuição fragmentada da elastina na MEC. Comumente, os processos que induzem a perda de função peniana estão associados com a elastose na MEC da túnica albugínea e do músculo liso⁽²²⁾. No entanto, nossos resultados indicaram um aumento 30 dias após a indução da DP, mas esse processo diz respeito à degradação das fibras elásticas e dispersão da elastina não-funcional. A degradação ocorre devido a um aumento na enzima elastase 2B 30 dias após injeção de TGF β para promover a indução da DP na túnica albugínea⁽²²⁾. Isso promove uma ruptura nas fibras elásticas, observadas como pequenos pontos na túnica albugínea e tecidos envoltos⁽⁴⁹⁾. Assim, a degradação da elastina leva à formação de placas mineralizadas devido ao contraste da alta deposição de colágeno I^(32,50). Essa fibra atua durante a ereção peniana para evitar ruptura tecidual após alongamento⁽²²⁾. As fibras elásticas se juntam às fibras colágenas para formar a resistência da MEC durante a ereção e retornar à forma flácida. Uma menor elasticidade, devido a aspectos morfológicos das fibras elásticas, resultam em disfunção erétil e está associada com o desenvolvimento da DP; enquanto, sob tratamento com MMF, as fibras elásticas retornaram ao seu estado padrão⁽⁴⁸⁾.

O tratamento com MMF apresentou uma pequena restauração nas fibras elásticas com sete dias e um aumento na presença do arranjo fibrilar com 30 dias. Além da integridade estrutural e de conferir elasticidade à túnica albugínea⁽⁴⁸⁾, as células musculares lisas são responsáveis pela secreção de parte do sistema elástico. Além disso, a população fibroblástica no tecido conjuntivo pode produzir elastina, como fibroblastos e miofibroblastos⁽²⁶⁾. Aqui, observamos um aumento de miofibroblastos no grupo tratado

com MMF, o que pode indicar, nesse ponto de discussão, um papel da elastina. Sob lesão tecidual com expressão do TGF β , a população fibroblástica aumenta a síntese de elastina, no entanto, a transição fibroblasto para miofibroblasto aumenta em um microambiente rico em matricinas, ou seja, partes de fibras da MEC parcialmente degradadas ^(26,51). Ambos os cenários ocorreram no nosso experimento, desde a indução da DP que foi promovida pela injeção de TGF β e a secreção dos fibroblastos criando um microambiente pró-fibrótico. Além disso, a degradação e a formação de matricinas 30 dias após a indução da DP (com ou sem tratamento com MMF) poderiam estar diretamente associadas ao aumento de miofibroblastos na região da túnica albugínea. Entretanto, observamos que o percentual e a integridade das fibras elásticas foram menos afetados com sete dias de tratamento com MMF, assim como a transição dos miofibroblastos no mesmo período, o que indica que o MMF desempenhou um papel relevante na prevenção do desenvolvimento da DP mais precocemente.

Os elementos não-fibrilares da MEC também são remodelados após lesão na túnica albugínea. Proteoglicanos são elementos que aumentam a atividade do TGF β nos tecidos pelos proteoglicanos ligantes de membrana, como o Syndecan, ou proteoglicanos de alto peso molecular envolvidos na conectividade da matriz, como o ácido hialurônico ^(15,52). As colorações histológicas auxiliam na avaliação de proteoglicanos na MEC, como Alcian azul e Safranin-O, assim como a coloração com ferro coloidal que permite observar proteoglicanos de baixo peso molecular (Hong et al., 2000), como sulfato de dermatano e proteoglicanos associados ao sulfato de condroitina ⁽⁴³⁾. No desenvolvimento e nos estágios avançados, os proteoglicanos estão aumentados na túnica albugínea e na placa mineralizada ^(15,21). Nossos resultados demonstraram um aumento com sete e 30 dias após injeção de TGF β para promover a DP. No entanto, o MMF foi capaz de diminuir

os proteoglicanos na região da túnica albugínea com 30 dias para valores similares aos do grupo controle. Esses resultados demonstraram a importância do aumento precoce dos proteoglicanos no desenvolvimento da DP, enquanto o MMF modulou sua quantidade em 30 dias. Como componente relevante para a fibrilogênese do colágeno e, portanto, para o desenvolvimento do processo fibrótico na DP, a diminuição da quantidade de proteoglicanos pode estar diretamente relacionada à diminuição do conteúdo de colágeno e à remodelação nos grupos MMF^(36,53). Além disso, o remodelamento dos proteoglicanos durante o desenvolvimento da DP está relacionada aos efeitos tardios do TGF β relacionados à ativação de MMPs para degradar os componentes da MEC ^(15,22).

Na nossa análise, a expressão de MMP foi relevante e corrobora com os resultados do remodelamento do colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos. Apesar de existirem várias classes de MMP, nossa análise avaliou a expressão de duas collagenases (MMP-2 e MMP-9) e uma estromelisina (MMP-3). A expressão das collagenases foi especificamente relevante com 7 dias, ou seja, nas fases iniciais do remodelamento da MEC da DP com ou sem tratamento com MMF. Ambas as collagenases, MMP-2 e MMP-9, promoveram degradação de colágeno durante o processo de fibrose ^(36,54). Contudo, a MMP-9 apresentou uma alta expressão com 7 dias após tratamento com MMF comparado a somente indução com TGF β , enquanto a MMP-2 foi altamente expressa aos 30 dias com o tratamento com MMF, o que poderia estar relacionado à diminuição do colágeno na túnica albugínea. Estudo prévio demonstrou que a expressão de MMP-2 e MMP-9 não se alteram após o desenvolvimento da placa no pênis humano ⁽¹⁵⁾. Desse modo, nossos resultados destacaram que ambas as collagenases suportam diferentes estágios do papel antifibrótico do MMF para recuperar a integridade da túnica albugínea e evitar o desenvolvimento da DP. Com relação ao MMP-3, sua expressão aumentou com sete dias

de indução com TGF β , mas o tratamento com MMF não alterou sua expressão no mesmo período a apresentou elevada expressão com 30 dias. O recrutamento do MMP-3 pode estar relacionado com a degradação dos proteoglicanos, restaurando os níveis padrão, e evitando o desenvolvimento da DP⁽⁵⁵⁾.

A realização de novos estudos a fim de buscar novos tratamentos para DP é válida; uma vez que há uma falta de um tratamento eficaz, livre de complicações e com pouco ou nenhum efeito colateral. O MMF é uma droga segura já utilizada há longo tempo para outras finalidades, com evidências de uma ação anti-fibrótica. Desse modo, justifica-se a avaliação do seu efeito neste estudo. Um estudo prévio conduzido por nossa equipe já havia demonstrado resultados animadores em sua ação anti-fibrótica⁽²³⁾. Diante desses fatos, acreditamos que um estudo em humanos seria um próximo passo para avaliarmos a real ação desta droga na DP.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- 1- A injeção intratúnica de TGF β foi capaz de gerar alterações fibróticas de matriz extracelular na túnica albugínea peniana em ratos Wistar, coincidentes com os achados histológicos para a doença de Peyronie.
- 2- No modelo em estudo de indução de doença de Peyronie em rato Wistar pela injeção de TGF- β ; o MMF atua como agente antifibrótico remodelador dos elementos da matriz extracelular.
- 3- Os resultados apontam fortemente para a efetiva participação dos proteoglicanos e , principalmente, das MMPs no processo de gênese da doença e mitigação dos efeitos com o tratamento pelo MMF.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - de la Peyronie F. Sur quelques obstacles qui s'opposent a l'ejaculation naturelle de la semence. Mem. Acad. R. Chir. 1743; 1: 425-34.
- 2 - Chung PH, Han TM, Rudnik B, Das AK. Peyronie's disease: what do we know and how do we treat it? Can J Urol. 2020 Aug;27(S3):11-19.
- 3 - Hinz J, Soave A, Cremers JF. Current treatment concepts for Peyronie's disease. Urologie. 2023 Dec;62(12):1332-1342. doi: 10.1007/s00120-023-02213-2. Epub 2023 Nov 3. PMID: 37922029.
- 4 - Gianazza S, Belladelli F, Leni R, Masci F, Rossi P, Giancesini G, et al. Peyronie's disease development and management in diabetic men. Andrology. 2023 Feb;11(2):372-378. doi: 10.1111/andr.13224. Epub 2022 Jul 26. PMID: 35771713.
- 5 - Sun AJ, Li S, Eisenberg ML. The Impact of Clostridium Histolyticum Collagenase on the Prevalence and Management of Peyronie's Disease in the United States. World J Mens Health. 2019 May;37(2):234-239. doi: 10.5534/wjmh.180073. Epub 2018 Nov 30. PMID: 30588781.
- 6 - Ziegelmann MJ, Bajic P, Levine LA. Peyronie's disease: Contemporary evaluation and management. Int J Urol. 2020 Jun;27(6):504-516. doi: 10.1111/iju.14230. Epub 2020 Apr 6.
- 7 - Terrier JE, Nelson CJ. Psychological aspects of Peyronie's disease. Transl Androl Urol. 2016 Jun;5(3):290-5. doi: 10.21037/tau.2016.05.14.
- 8 - Piraino J, Chaudhary H, Ames K, Okoye F, Sterling M, Clavell-Hernandez J, et al. A Consistent Lack of Consistency in Defining the Acute and Chronic Phases of Peyronie's Disease: A Review of the Contemporary Literature. Sex Med Rev. 2022 Oct 1;10(4):698-713. doi: 10.1016/j.sxmr.2022.08.001. PMID: 37051957.

- 9 - Brimley SC, Yafi FA, Greenberg J, Hellstrom WJG, Tue Nguyen HM, Hatzichristodoulou G. Review of Management Options for Active-Phase Peyronie's Disease. *Sex Med Rev.* 2019 Apr;7(2):329-337. doi: 10.1016/j.sxmr.2018.09.007. Epub 2018 Nov 30. PMID: 30503796.
- 10 - Cocci A, Di Maida F, Russo GI, Capogrosso P, Francesco L, Rizzo M et al. Efficacy of Collagenase Clostridium histolyticum (Xiapex®) in Patients with the Acute Phase of Peyronie's Disease. *Clin Drug Investig.* 2020 Jun;40(6):583-588. doi: 10.1007/s40261-020-00916-4. Erratum in: *Clin Drug Investig.* 2021 May;41(5):497. PMID: 32342279.
- 11 - Gabrielsen JS. Peyronie's disease: is it genetic or not? *Transl Androl Urol.* 2020 Mar;9(Suppl 2):S262-S268. doi: 10.21037/tau.2019.10.21. PMID: 32257867; PMCID: PMC7108984.
- 12 - Kadioglu A, Dincer M, Salabas E, Culha MG, Akdere H, Cilesiz NC. A Population-Based Study of Peyronie's Disease in Turkey: Prevalence and Related Comorbidities. *Sex Med.* 2020 Dec;8(4):679-685. doi: 10.1016/j.esxm.2020.09.002. PMID: 33243422; PMCID: PMC7691981.
- 13 - Bilgutay AN, Pastuszak AW. PEYRONIE'S DISEASE: A REVIEW OF ETIOLOGY, DIAGNOSIS, AND MANAGEMENT. *Curr Sex Health Rep.* 2015 Jun 1;7(2):117-131. doi: 10.1007/s11930-015-0045-y. PMID: 26279643; PMCID: PMC4535719.
- 14 - Patel DP, Christensen MB, Hotaling JM, Pastuszak AW. A review of inflammation and fibrosis: implications for the pathogenesis of Peyronie's disease. *World J Urol.* 2020 Feb;38(2):253-261. doi: 10.1007/s00345-019-02815-6. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31190155; PMCID: PMC7333524.

15 - Watanabe MS, Theodoro TR, Coelho NL, Mendes A, Leonel MLP, Mader AM, Nader HB, Glina S, Pinhal MAS. Extracellular matrix alterations in the Peyronie's disease. *J Adv Res.* 2017 Jul;8(4):455-461. doi: 10.1016/j.jare.2017.06.004. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28721300; PMCID: PMC5491452.

16 - Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 20;21(24):9739. doi: 10.3390/ijms21249739. PMID: 33419373; PMCID: PMC7767220.

17 - Mitsui Y, Yamabe F, Hori S, Uetani M, Kobayashi H, Nagao K, Nakajima K. Molecular Mechanisms and Risk Factors Related to the Pathogenesis of Peyronie's Disease. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 14;24(12):10133. doi: 10.3390/ijms241210133. PMID: 37373277; PMCID: PMC10299070.

18 - Chuang HM, Chen YS, Harn HJ. The Versatile Role of Matrix Metalloproteinase for the Diverse Results of Fibrosis Treatment. *Molecules.* 2019 Nov 19;24(22):4188. doi: 10.3390/molecules24224188. PMID: 31752262; PMCID: PMC6891433.

19 - Castiglione F, Hedlund P, Weyne E, Hakim L, Montorsi F, Bivalacqua T, et al. Trauma and Reconstructive Urology Working Party of the European Association of Urology Young Academic Urologists. Intratunical Injection of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Restores Collagen III/I Ratio in a Rat Model of Chronic Peyronie's Disease. *Sex Med.* 2019 Mar;7(1):94-103. doi: 10.1016/j.esxm.2018.09.003. Epub 2018 Nov 30. PMID: 30503767; PMCID: PMC6377372.

20 - Castiglione F, Hedlund P, Weyne E, Hakim L, Montorsi F, Salonia A, et al. Trauma and Reconstructive Urology Working Party of the European Association of Urology

(EAU) Young Academic Urologists (YAU). Intratunical injection of stromal vascular fraction prevents fibrosis in a rat model of Peyronie's disease. *BJU Int.* 2019 Aug;124(2):342-348. doi: 10.1111/bju.14570. Epub 2019 Jun 2. PMID: 30267556.

21 - Ustriyana P, Hennefarth MR, Srirangapatanam S, Jung H, Wang Y, Chen L, Lue TF, Lin G, Kang M, Stoller ML, Ho SP. Mineralized Peyronie's plaque has a phenotypic resemblance to bone. *Acta Biomater.* 2022 Mar 1;140:457-466. doi: 10.1016/j.actbio.2021.11.025. Epub 2021 Nov 21. PMID: 34818578.

22 - Gundogdu G, Nguyen T, Namasivayam A, Starek S, Gelman J, Mauney JR. Characterization of a novel rabbit model of Peyronie's disease. *Int J Impot Res.* 2024 May;36(3):269-274. doi: 10.1038/s41443-023-00671-y. Epub 2023 Feb 13. PMID: 36782023; PMCID: PMC11035118.

23 - Antoniassi TS, Spessoto LCF, Gonçalves Filho JR, Cavalcante VMM, da Silva EA, Facio MFW et al. Risk factors for Peyronie's disease in patients submitted to the Nesbit procedure. *Int J Sci* 2016; 5:131-3.

24 - Haag SM, Hauck EW, Szardening-Kirchner C, Diemer T, Cha ES, Weidner W, Eickelberg O. Alterations in the transforming growth factor (TGF)-beta pathway as a potential factor in the pathogenesis of Peyronie's disease. *Eur Urol.* 2007 Jan;51(1):255-61. doi: 10.1016/j.eururo.2006.05.002. Epub 2006 May 19. PMID: 16782264.

25 - Breton JD, Heydet D, Starrs LM, Veldre T, Ghildyal R. Molecular changes during TGFβ-mediated lung fibroblast-myofibroblast differentiation: implication for glucocorticoid resistance. *Physiol Rep.* 2018 Apr;6(7):e13669. doi: 10.14814/phy2.13669. PMID: 29654633; PMCID: PMC5899214.

26 - Do NT, Lee SY, Lee YS, Shin C, Kim D, Lee TG, Son JG, Kim SH. Time-sequential fibroblast-to-myofibroblast transition in elastin-variable 3D hydrogel environments by

collagen networks. *Biomater Res.* 2023 Oct 17;27(1):103. doi: 10.1186/s40824-023-00439-x. PMID: 37848974; PMCID: PMC10583321.

27 - Gonzalez-Cadavid NF. Mechanisms of penile fibrosis. *J Sex Med.* 2009 Mar;6 Suppl 3:353-62. doi: 10.1111/j.1743-6109.2008.01195.x. PMID: 19267860.

28 - Paulis G, De Giorgio G, Paulis A. Ultrasound Elastography as a Diagnostic Tool for Peyronie's Disease: A State-of-the-Art Review. *Diagnostics (Basel).* 2024 Mar 21;14(6):665. doi: 10.3390/diagnostics14060665. PMID: 38535085; PMCID: PMC10969672.

29 - Nehra A, Alterowitz R, Culkin DJ, Faraday MM, Hakim LS, Burnett AL; American Urological Association Education and Research, Inc.,. Peyronie's Disease: AUA Guideline. *J Urol.* 2015 Sep;194(3):745-53. doi: 10.1016/j.juro.2015.05.098. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26066402; PMCID: PMC5027990.

30 - Moisés da Silva GV, Dávila FJ, Rosito TE, Martins FE. Global Perspective on the Management of Peyronie's Disease. *Front Reprod Health.* 2022 Jun 9;4:863844. doi: 10.3389/frph.2022.863844. PMID: 36303674; PMCID: PMC9580779.

31 - Hayat S, Brunckhorst O, Alnajjar HM, Cakir OO, Muneer A, Ahmed K. A systematic review of non-surgical management in Peyronie's disease. *Int J Impot Res.* 2023 Sep;35(6):523-532. doi: 10.1038/s41443-022-00633-w. Epub 2022 Oct 26. PMID: 36289392; PMCID: PMC10499596.

32 - Reddy AG, Dai MC, Song JJ, Pierce HM, Patel SR, Lipshultz LI. Peyronie's Disease: An Outcomes-Based Guide to Non-Surgical and Novel Treatment Modalities. *Res Rep Urol.* 2023 Feb 2;15:55-67. doi: 10.2147/RRU.S278796. PMID: 36756281; PMCID: PMC9901485.

- 33 - Carson C. Peyronie's disease: new paradigm for the treatment of a unique cause of erectile dysfunction. *Postgrad Med.* 2020 Dec;132(sup4):4-8. doi: 10.1080/00325481.2020.1805865. Epub 2020 Nov 6. PMID: 33156731.
- 34 - Tsambarlis P, Levine LA. Nonsurgical management of Peyronie's disease. *Nat Rev Urol.* 2019 Mar;16(3):172-186. doi: 10.1038/s41585-018-0117-7. PMID: 30397330.
- 35 - Talib RA, Ibrahim MA, Cangüven Ö. Nonsurgical treatment options in Peyronie's Disease: 2016 update. *Turk J Urol.* 2016 Dec;42(4):217-223. doi: 10.5152/tud.2016.40799. PMID: 27909612; PMCID: PMC5125733.
- 36 - Krakhotkin DV, Chernylovskiy VA, Mottrie A, Greco F, Bugaev RA. New insights into the pathogenesis of Peyronie's disease: A narrative review. *Chronic Dis Transl Med.* 2020 Jul 27;6(3):165-181. doi: 10.1016/j.cdtm.2020.06.001. PMID: 32885153; PMCID: PMC7451633.
- 37 - Ilg MM, Mateus M, Stebbeds WJ, Milenkovic U, Christopher N, Muneer A, Albersen M, Ralph DJ, Celtek S. Antifibrotic Synergy Between Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors and Selective Oestrogen Receptor Modulators in Peyronie's Disease Models. *Eur Urol.* 2019 Feb;75(2):329-340. doi: 10.1016/j.eururo.2018.10.014. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30344087.
- 38 - Tashkin DP, Roth MD, Clements PJ, Furst DE, Khanna D, Kleerup EC et al. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): a randomized controlled, double-blind, parallel group trial. *Lancet Respir Med.* 2016 Sep;4(9):708-719. doi: 10.1016/S2213-2600(16)30152-7. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27469583; PMCID: PMC5014629.
- 39 - Aditya I, Kwong JCC, Krakowsky Y, Grober ED. Non-conventional therapies for Peyronie's disease: what is the evidence for efficacy? *Transl Androl Urol.* 2020

Mar;9(Suppl 2):S295-S302. doi: 10.21037/tau.2019.09.36. PMID: 32257870; PMCID: PMC7108993.

40 - Navarro KL, Huss M, Smith JC, Sharp P, Marx JO, Pacharinsak C. Mouse Anesthesia: The Art and Science. ILAR J. 2021 Dec 31;62(1-2):238-273. doi: 10.1093/ilar/ilab016. PMID: 34180990; PMCID: PMC9236661.

41 - Gokce A, Abd Elmageed ZY, Lasker GF, Bouljihad M, Braun SE, Hellstrom WJ et al. Intratunical Injection of Genetically Modified Adipose Tissue-Derived Stem Cells with Human Interferon α -2b for Treatment of Erectile Dysfunction in a Rat Model of Tunica Albugineal Fibrosis. J Sex Med. 2015 Jul;12(7):1533-44. doi: 10.1111/jsm.12916. Epub 2015 Jun 10. PMID: 26062100; PMCID: PMC4914049.

42 - American Veterinary Medical Association. Guideline for the Euthanasia of animals: ed. 2013; p.48 <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>

43 - Suvarna, Kim S.; Layton, Christopher; Bancroft, J. D. *Bancroft's theory and practice of histological techniques*; 7^a ed. 2013 Elsevier Health Sciences. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

44 - de Carvalho HF, Taboga SR. Fluorescence and confocal laser scanning microscopy imaging of elastic fibers in hematoxylin-eosin stained sections. Histochem Cell Biol 1996;106:587-92.

45 - Castiglione F, Hedlund P, Weyne E, Hakim L, Montorsi F, Bivalacqua TJ, De Ridder D, Milenkovic U, Ralph D, Garaffa G, Muneer A, Joniau S, Albersen M; Trauma and Reconstructive Urology Working Party of the European Association of Urology Young Academic Urologists. Intratunical Injection of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Restores Collagen III/I Ratio in a Rat Model of Chronic Peyronie's Disease. Sex

Med. 2019 Mar;7(1):94-103. doi: 10.1016/j.esxm.2018.09.003. Epub 2018 Nov 30. PMID: 30503767; PMCID: PMC6377372.

46 - Badid C, Vincent M, McGregor B, Melin M, Hadj-Aissa A, Veyseyre C, Hartmann DJ, Desmouliere A, Laville M. Mycophenolate mofetil reduces myofibroblast infiltration and collagen III deposition in rat remnant kidney. *Kidney Int.* 2000 Jul;58(1):51-61. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00140.x. PMID: 10886549.

47 - Abdelwahab OA, Mechi A, Gahlan S, Hamadein FE, Kadhim H, Ismail D, Soliman Y, El-Samahy M. Efficacy and safety of mycophenolate mofetil in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2024 Feb;43(2):621-632. doi: 10.1007/s10067-023-06820-4. Epub 2023 Nov 20. PMID: 37981614; PMCID: PMC10834632.

48 - Hota T, Lorenzini F, Melchiorretto EF, Zeni M, Veronez DADL, Fraga R. Stereological analysis of elastic fibers of the corpus cavernosum of rats during the aging process. *Acta Cir Bras.* 2019 Oct 14;34(8):e201900803. doi: 10.1590/s0102-865020190080000003. PMID: 31618403; PMCID: PMC6799974.

49 - Schmelzer, C. E. H., & Duca, L. (2022). Elastic fibers: formation, function, and fate during aging and disease. *FEBS Journal*, 289(13), 3704–3730. <https://doi.org/10.1111/febs.15899>

50 - Halsey G, Sinha D, Dhital S, Wang X, Vyavahare N. Role of elastic fiber degradation in disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2023 Jun;1869(5):166706. doi: 10.1016/j.bbadis.2023.166706. Epub 2023 Mar 29. PMID: 37001705.

51 - Lee WJ, Ahn HM, Na Y, Wadhwa R, Hong J, Yun CO. Mortalin deficiency suppresses fibrosis and induces apoptosis in keloid spheroids. *Sci Rep.* 2017 Oct

11;7(1):12957. doi: 10.1038/s41598-017-13485-y. PMID: 29021584; PMCID: PMC5636810.

52 - Farach-Carson MC, Wu D, França CM. Proteoglycans in mechanobiology of tissues and organs: Normal functions and mechanopathology. *Proteoglycan Research* 2024, 2, e21. <https://doi.org/10.1002/pgr2.21>

53 - Lord MS, Tang F, Rnjak-Kovacina J, Smith JGW, Melrose J, Whitelock JM. The multifaceted roles of perlecan in fibrosis. *Matrix Biol.* 2018 Aug;68-69:150-166. doi: 10.1016/j.matbio.2018.02.013. Epub 2018 Feb 20. PMID: 29475023.

54 - Zhao X, Chen J, Sun H, Zhang Y, Zou D. New insights into fibrosis from the ECM degradation perspective: the macrophage-MMP-ECM interaction. *Cell Biosci.* 2022 Jul 27;12(1):117. doi: 10.1186/s13578-022-00856-w. Erratum in: *Cell Biosci.* 2022 Aug 26;12(1):138. doi: 10.1186/s13578-022-00881-9. PMID: 35897082; PMCID: PMC9327238.

55 - Shi L, Liang T, Yang F, Zhu FF, Liu J, Jiang JQ et al. Matrix Metalloproteinase-3 induces proteoglycan degradation in gouty arthritis model. *Gene.* 2021 Jan 10;765:145120. doi: 10.1016/j.gene.2020.145120. Epub 2020 Sep 5. PMID: 32896590.

ANEXO 1



Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
Autarquia Estadual – Lei nº 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal nº 74.179 de 14/06/74)



LICENÇA CEUA 09/2019

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO DE PROJETO APROVADO

(DE ACORDO COM ORIENTAÇÃO TÉCNICA CONCEA Nº 08 DE 18 DE MARÇO DE 2016)

Certificamos que a proposta intitulada “**Comportamento dos elementos celulares da matriz extracelular da matriz extracelular na doença de peyronie experimentalmente induzida pelo TGF - beta e tratada com Micofenolato Mofetil**”, protocolo FAMERP nº 001-003819/2019, em 02 de setembro de 2019, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Fernando Nestor Facio Junior, que envolve a produção/ manutenção/utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FAMERP (CEUA-FAMERP) em reunião no dia 13 de novembro 2019.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO	Outubro/2019 à 31/03/2020
ESPÉCIE	Ratos Wistar
Nº DE ANIMAIS	26
PESO/IDADE	adultos
SEXO	machos
ORIGEM	Comercial

São José do Rio Preto, 19 de novembro de 2019.

Heloisa C. Caldas

Profa. Dra. Heloisa Cristina Caldas

Vice Presidente CEUA

(Portaria FAMERP 109, de 28 de outubro de 2014 – DOESP de 05 de novembro de 2014, Poder Executivo – Seção I, 124(209) – 57)