

Studio ultrastrutturale *in vivo* del tessuto cavernoso clitorideo

S. CARUSO*, A. CIANCI*, C. MALANDRINO*, L. CAVALLARI**, O. GAMBADORO**, G. ARENA**, L. PISPISA**, L. LO PRESTI*, C. CICERO*, M. ROMANO*, V. CAVALLARI**

RIASSUNTO: Studio ultrastrutturale *in vivo* del tessuto cavernoso clitorideo.

S. CARUSO, A. CIANCI, C. MALANDRINO, L. CAVALLARI, O. GAMBADORO, G. ARENA, L. PISPISA, L. LO PRESTI, C. CICERO, M. ROMANO, V. CAVALLARI

Obiettivo. Attualmente non vi sono indagini concernenti lo studio *in vivo* della struttura del clitoride. Scopo dello studio è stato quello di valutare *in vivo* l'ultrastruttura clitoridea e le sue modificazioni tissutali, connesse all'età, presenti in donne sane e in donne affette da malattia metabolica.

Metodi. Il campione di donne esaminato comprende 43 donne, di cui: 5 teenager, di età compresa tra i 14 e i 18 anni; 8 giovani donne in età fertile, tra i 23 e i 32 anni; 10 donne in premenopausa, tra i 38 e i 47 anni; 9 donne diabetiche in premenopausa, tra i 27 e i 43 anni; 11 donne in postmenopausa fisiologica tra i 51 e i 55 anni. Ciascuna donna è stata sottoposta a microbiopsia percutanea del clitoride mediante pistola semiautomatica, dotata di ago sottile, nel corso di interventi ginecologici eseguiti in anestesia generale. Il tessuto prelevato è stato preparato secondo le procedure standard per l'indagine ultrastrutturale eseguita attraverso microscopia elettronica.

Risultati. Il tessuto cavernoso delle adolescenti e delle giovani donne ha mostrato un'ampia componente di Fibrocelle Muscolari Lisce (FML); il tessuto connettivo intercellulare appare scarso con poche fibre collagene isometriche e matrice extracellulare amorfa. Nelle donne diabetiche in premenopausa sono state osservate anomalie delle FML, quali: incremento dei depositi di glicogeno, bordi cellulari ispessiti, vacuoli citoplasmatici; il connettivo intercellulare risulta aumentato con fibre collagene densamente impacchettate. Infine, nelle donne in postmenopausa fisiologica le FML appaiono moderatamente diminuite. Sono stati osservati cambiamenti ultrastrutturali degli spazi e delle lacune vascolari correlati all'età. Lo spessore medio delle cellule muscolari lisce si riduce progressivamente con l'età; le alterazioni vascolari appaiono connesse con la presenza di disordini metabolici, quale il diabete mellito.

Conclusioni. Il nostro studio *in vivo* ha fornito una migliore comprensione di alcuni aspetti fisiopatologici concernenti il ruolo del clitoride nella risposta sessuale femminile. In aggiunta alle evidenze scientifiche emerse dalla nostra ricerca, ulteriori indagini saranno necessarie per lo studio di sottogruppi di donne sane e disfunzionali.

SUMMARY: *In vivo* ultrastructural research of clitoris.

S. CARUSO, A. CIANCI, C. MALANDRINO, L. CAVALLARI, O. GAMBADORO, G. ARENA, L. PISPISA, L. LO PRESTI, C. CICERO, M. ROMANO, V. CAVALLARI

Introduction. There is not investigation about the *in vivo* clitoral structure. The purpose of our research is the study of the *in vivo* age-related structural changes of the clitoris in women affected by metabolic disorders and in healthy women.

Methods. Forty-three women sub grouping in: five teenagers, aged 14-18; eight young premenopausal women, aged 23-32 years; ten premenopausal women, aged 38-47 years; nine diabetic premenopausal women, aged 27-43 years; and eleven naturally postmenopausal women aged 51-55 years. Each woman underwent microbiopsy of the clitoral body with total anesthesia. The tissue removed was analyzed by electron microscopy.

Results. The cavernous tissue from the teenagers and young women showed large amounts of smooth muscle cells (SMCs). The intercellular connective tissue was scanty with small isometric collagen fibers. In the premenopausal diabetic women ultrastructural abnormalities of SMCs were observed. Moreover, the intercellular connective tissue was increased by densely packed collagen fibers. Finally, in the healthy natural postmenopausal women the SMCs were moderately reduced in number. We observed age-related structural changes of the vascular spaces and of the vascular lacunae. The SMC mean thickness was reduced with age; vascular abnormalities seems to be correlated with the presence of diabetes.

Conclusion. Our *in vivo* study could be useful to understand some aspects of the pathophysiology of the clitoris and its role in the sexual response. Moreover other investigations are needed to study subgroups of otherwise healthy sexually dysfunctional women.

KEY WORDS: Clitoride - Ultrastruttura - Microbiopsia - Fibrocelle muscolari lisce - Diabete.
Clitoris - Ultrastructure - Microbiopsy - Smooth muscle cells - Diabetes.

* Gruppo di Ricerca Sessuologica
Dipartimento Materno-Infantile e Scienze Radiologiche
Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Vittorio Emanuele, Catania
Università degli Studi di Catania
** Unità di Patologia Ultrastrutturale
Dipartimento di Patologia Umana
Università degli Studi di Messina

Introduzione

Nonostante i passi avanti fatti dalla sessuologia medica nel campo della fisiopatologia sessuale femminile, ad oggi, rispetto alla controparte maschile, si evidenziano ancora delle ampie lacune conoscitive riguardo gli aspetti ultrastrutturali e neurofisiologici del clitoride nell'ambito della risposta sessuale. Il comportamento sessuale di una donna può subire nel corso della vita delle modificazioni a causa delle influenze che esercitano fattori biologici ed ormonali, per cui l'ipotesi che alterazioni strutturali di quest'organo erettile possano causare disfunzioni sessuali, nelle donne in pre/postmenopausa ed affette da patologia metabolica, è del tutto ragionevole. L'anatomia macro- e microscopica del clitoride è stata in passato descritta in maniera affrettata o in maniera comparativa alla controparte maschile (1-4). Ad oggi dettagliati studi sull'anatomia e fisiologia clitoridea sono stati condotti su modelli animali (5-12); questi, pur dotati di una certa rilevanza scientifica, non possono sostituire la ricerca diretta su soggetti viventi. Un maggiore approfondimento a tale riguardo, negli ultimi anni, si è avuto grazie a più accurati studi di dissezione autoptica (13-15), all'analisi immunoistochimica (16-18) e a più moderne metodiche d'immagini, come la Risonanza Magnetica (19-22).

Tradizionalmente la descrizione dell'anatomia clitoridea, basata sui dati ottenuti dall'osservazione intraoperatoria e da studi di dissezione autoptica, è stata limitata dalla mancata possibilità di poterla studiare su donne viventi. Per anni, ci si è limitati a valutare la struttura di quest'organo erettile, nelle donne in postmenopausa, molto spesso distorta dalla presenza di atrofia tissutale legata all'età, dall'assenza di flusso sanguigno e dai processi di fissazione (23). Mancano in letteratura ricerche scientifiche volte a valutare gli aspetti anatomo-funzionali di quest'organo erettile su donne giovani; a tale riguardo sono stati condotti studi scientifici su tessuto clitorideo fetale umano e su donne sane in premenopausa mediante risonanza magnetica (24,25). L'insieme di questi fattori ha limitato l'approccio scientifico delle disfunzioni sessuali femminili. Alla luce delle informazioni fornite dalla letteratura, con il nostro studio sperimentale abbiamo voluto valutare l'ultrastruttura del tessuto erettile clitorideo su soggetti "viventi" ed analizzare le modificazioni ultrastrutturali che esso subisce, correlate all'età, in donne sane e in donne affette da diabete, mediante microbiopsia del clitoride e l'impiego della microscopia elettronica.

Materiali e metodi

Il campione esaminato comprende 43 donne, giunte al nostro Centro per sottoporsi ad intervento chirurgico

per patologie benigne uroginecologiche e reclutate volontariamente in seguito ad invito a partecipare allo studio clinico, previa acquisizione del consenso informato e in accordo con la dichiarazione di Helsinki del 1975. Abbiamo suddiviso le donne in 5 sottogruppi:

- 5 teenager, di età compresa tra i 14 e i 18 anni (età media, 16 ± 1.8 anni), con *Body Mass Index* (BMI) di 23.1 ± 3.1 kg/m² e parità media pari a 0;
- 8 giovani donne sane in età fertile, di età tra 23 e i 32 anni (età media, 27 ± 2.5 anni), con BMI di 24.3 ± 3.3 kg/m² e parità media pari a 1,3 figli;
- 10 donne in premenopausa di età tra i 38 e i 47 anni (età media, 43 ± 3.5 anni), con BMI di 25.2 ± 3.4 kg/m² e parità media pari a 2,4;
- 9 donne in premenopausa affette da diabete mellito tipo 1, di età compresa tra 27 e 43 anni (età media, 34 ± 3.6 anni), con BMI di 25.3 ± 3.8 kg/m² e parità media pari a 2,1;
- 11 donne in postmenopausa fisiologica di età compresa tra 51 e 55 anni (età media, 53 ± 3.2 anni), con BMI di $25 \pm 2,1$ Kg/m² e parità media di 3,2. Le donne in postmenopausa avevano avuto l'ultimo flusso mestruale spontaneo almeno 12 mesi prima dell'arruolamento.

Ciascuna donna è stata sottoposta ad anamnesi ginecologica e intervistata accuratamente sulla propria vita sessuale da un sessuologo specializzato. Successivamente, una valutazione ginecologica completa ed un esame ecografico sono stati eseguiti al fine di valutare la morfologia del clitoride e la sede più idonea all'esecuzione del prelievo bioptico. Tutte le donne sono state sottoposte a microbiopsia del clitoride che consiste in un prelievo, per via percutanea, di un frammento di tessuto clitorideo mediante ago sottile, da sottoporre ad esame microscopico. La tecnica prevede l'uso della pistola semiautomatica (Precisa™, HS Hospital Service, Aprilia, Latina, Italy), dotata di ago sottile (lungo 100 mm e diametro 18 G). Al termine della procedura, i frustoli di tessuto cavernoso prelevati sono stati inseriti in una provetta contenente liquido di Karnovsky, idoneo alla sua conservazione, fissati a 4°C per 2 ore, trattati secondo le procedure standard ed inviati all'indagine ultrastrutturale.

Analisi statistica. In questo studio preliminare, al fine di descrivere la popolazione di Fibrocellule Muscolari Lisce (FML) nei frustoli di tessuto ottenuti, abbiamo proposto un modalità alternativa di valutazione, basata sulla ricerca delle unità funzionali FML-lacune vascolari nei diversi campi di osservazione e sulla misurazione dello spessore medio delle fibrocellule muscolari lisce ottenuto delineando i due

lati opposti sul profilo delle stesse secondo il proprio asse longitudinale. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un pacchetto software per Windows 95 (Grantz SA, Primer di Biostatistica, McGraw-Hill, New York, 1997).

Risultati

L'esame microscopico eseguito su frustoli clitoridei ha mostrato come l'ultrastruttura del corpo cavernoso del clitoride riproduca essenzialmente quella del corpo cavernoso penieno.

Valutazione ultrastrutturale quantitativa. La Figura 1 mostra il valore dello spessore medio (in micron) delle FML, ottenuto delineando i due lati opposti del profilo delle stesse nel contesto del tessuto cavernoso clitorideo.

Valutazione ultrastrutturale qualitativa. Dallo studio qualitativo, il tessuto cavernoso delle teenager mostra una larga rappresentanza di FML in stretta relazione con la sottile parete degli spazi vascolari. Particolare interesse rivestono le lacune vascolari rivestite da un'unica fila di cellule endoteliali appiattite con citoplasmici relativamente poveri in organuli, poggianti su membrane basali continue; le FML interstiziali, che rappresentano la maggioranza degli elementi cellulari riconosciuti nell'interstizio del tessuto erettile in esame, contraggono rapporti diretti con le lacune vascolari, dando luogo ad un complesso anatomico-funzionale paragonabile a quello dimostrato nei corpi cavernosi del pene. Esse risultano isometriche e mostrano contorni regolari, nuclei indentati con cromatina addensata e nucleoli evidenti. Il loro citoplasma comprende una distribuzione omogenea di microfilamenti contrattili, corpi densi, che si ritrovano anche in sede sub-plasmalemmale, e mitocondri. I bordi cellulari sono provvisti di Membrane Basali (MB) continue e giunzioni elettro-ioniche di tipo *tight*. Le membrane basali sono regolari e di spessore costante, raramente reduplicate. Il tessuto connettivo intercellulare appare scarso con poche fibre collagene isometriche e matrice extracellulare amorfa. Nelle donne giovani sane, in età fertile, sono stati riscontrati bordi cellulari irregolari. Lo spazio intercellulare contiene abbondanti fibre collagene densamente impacchettate e il tessuto collagene intercellulare appare incrementato. Nelle donne in premenopausa, le FML appaiono ridotte quantitativamente, focalmente assottigliate e dismetriche. I bordi cellulari sono occasionalmente ripiegati. Le membrane basali sono sottili o leggermente ispessite. Gli spazi intercellulari contengono più collagene e lo spazio vascolare mostra diffuso ispessimento della membrana basale endoteliale. Nelle donne in postmenopausa fisiologica, l'architettura genera-

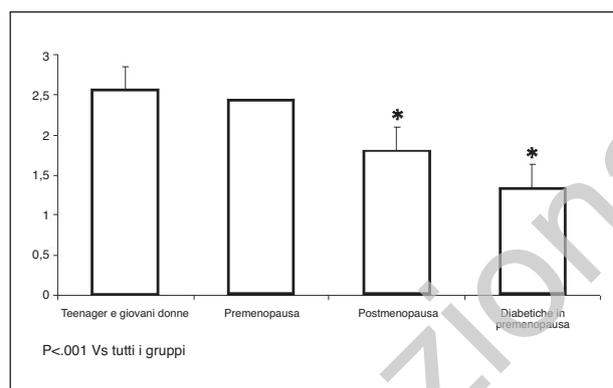


Fig. 1 - Spessore medio (in micron) delle FML ottenuto delineando i due lati opposti del profilo delle stesse.

le del tessuto erettile è conservata: si osserva un discreto diradamento e assottigliamento delle FML, che possono a tratti mostrare contorni festonati. L'interstizio, composto da fibre collagene isometriche scarsamente coese, appare moderatamente ispessito. Non è stato osservato alcun ispessimento delle membrane basali. In una condizione di squilibrio metabolico, quale la malattia diabetica, nelle donne in premenopausa sono state osservate anomalie delle FML: incremento dei depositi di glicogeno, bordi cellulari ripiegati, vacuoli citoplasmatici e un focale incremento della densità elettronica delle FML; la matrice intercellulare non mostra sostanziali differenze rispetto al corrispondente gruppo di donne di eguale range d'età non diabetiche. Le alterazioni ultrastrutturali riscontrate nelle donne diabetiche in premenopausa sono comparabili a quelle delle donne sane in postmenopausa (Fig. 2).

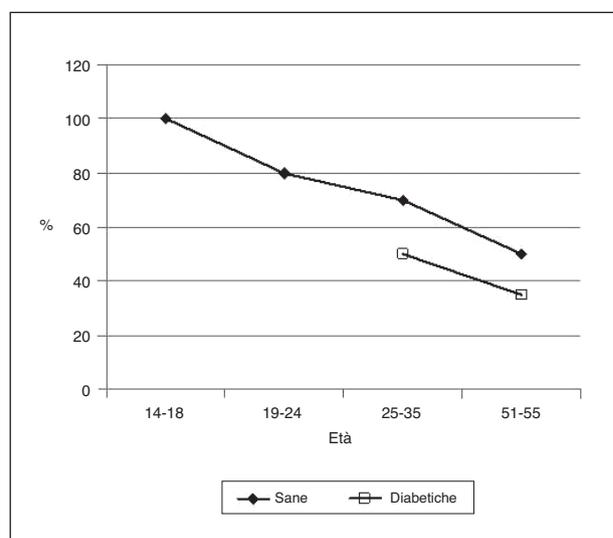


Fig. 2 - Alterazioni ultrastrutturali del complesso anatomico-funzionale FML-lacune vascolari.

Discussione

Sulla base dei dati forniti da una estesa revisione della letteratura, questa ricerca rappresenta il primo studio scientifico ultrastrutturale condotto *in vivo*, ovvero su tessuto cavernoso clitorideo funzionalmente attivo di donne viventi in pre- e postmenopausa e diabetiche. Precedenti studi hanno mostrato come la prevalenza dei disturbi sessuali femminili correli con l'incremento dell'età (26,27). Secondo quanto riportato da uno studio di istomorfometria, condotto su tessuto cavernoso prelevato da cadaveri, la struttura microscopica del tessuto erettile clitorideo varia in funzione dell'età, per un progressivo aumento del tessuto connettivo fibroso, una parallela diminuzione della quota di fibrocellule muscolari lisce presenti, che rappresentano un'importante componente ultrastrutturale dell'emodinamica clitoridea. Inoltre è stato riscontrato un decremento delle dimensioni del lume dell'arteria cavernosa del clitoride per l'ispessimento della parete vasale dovuta a processi aterosclerotici a carico dell'intima e della media della stessa (28). Questi cambiamenti strutturali che il tessuto erettile subisce con l'avanzare dell'età, confermati dal nostro studio condotto su donne viventi, interferiscono con il fisiologico meccanismo di rilasciamento dello stesso, per cui potrebbero essere messi in relazione con i disturbi dell'eccitamen-

to sessuale frequentemente riportati nelle donne di età avanzata. Studi scientifici hanno mostrato come il diabete mellito produca dei significativi effetti avversi sull'emodinamica della tumescenza del clitoride (29,30). L'insieme di questi fattori ha un potenziale impatto sulla fibrosi dei corpi cavernosi, contribuendo alla fisiopatologia dei disturbi dell'eccitamento femminile, come dimostrato anche da studi condotti su donne e su modelli animali (31-38).

Conclusioni

L'importanza scientifica e sperimentale del nostro studio sta proprio nell'aver considerato l'ultrastruttura clitoridea *in vivo*, ovvero su tessuto vivente, privo di distorsioni anatomiche *post mortem*, e funzionalmente attivo, fornendo, così, una conoscenza più concreta della sua anatomia funzionale, rispetto a quanto definito dalla letteratura e dagli studi di dissezione autopica. Anche se non vi è una chiara evidenza clinica delle disfunzioni sessuali durante la terza e la quarta decade di vita, i cambiamenti delle strutture anatomo-funzionali coinvolte nella risposta sessuale femminile sono oggi evidenti. In aggiunta alle evidenze ottenute da questa ricerca, ulteriori indagini sono necessarie per lo studio di sottogruppi di donne sane e disfunzionali.

Bibliografia

- McMinn RMH. Last's Anatomy. Regional and Applied. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990.
- Agur A. Grant's Atlas of Anatomy, 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991.
- Williams PL et al. Gray's Anatomy, 38th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995.
- Sinnatamby CS. Last's Anatomy. Regional and Applied, 10th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp. 298-314, 1999.
- Bechara AJ, Cao G, Casabe AR, Romano SV, Toblli JE: Morphological modifications in clitoris and vagina in spontaneously hypertensive rats. Int J Impot Res 2003; 15:166-72.
- Min K, O'Connell L, Munarriz R, Huang YH, Choi S, Kim N, Goldstein I, Traish A: Experimental models for the investigation of female sexual function and dysfunction. Int J Impot Res 2001;13(3):151-6.
- Munarriz R., Kim SW, Kim NN, Traish A and Goldstein I: A review of the physiology and pharmacology of peripheral (vaginal and clitoral) female genital arousal in the animal model. J Urol 2003;170:S40-S45.
- Beldekas JC, Smith B, Gerstenfeld LC, Sonenshein GE and Franzblau C: Effects of 17 beta-estradiol on the biosynthesis of collagen in cultured bovine aortic smooth muscle cells. Biochemistry 1981;20:2162.
- Bhalla RC, Toth KF, Bhatti RA, Thompson LP and Sharma RV: Estrogen reduces proliferation and agonist induced calcium increase in coronary artery smooth muscle cells. Am J Physiol 1997;272:H1996.
- Park K, Ahn K, Lee S, Ryu S, Park Y, Azadzi KM: Decreased circulating levels of estrogen alter vagina and clitoral blood flow and structure in the rabbit. Int. J. Impot Res 2001;13(2):116-24.
- Yoon HN, Chung WS, Park YY, Shim BS, Han WS, Kwon SW: Effects of estrogen on nitric oxide synthase and histological composition in the rabbit clitoris and vagina. Int J Impot Res 2001;13(4):205-11.
- Dündar M, Koçak I, Erkus M, Celasun B: The effect of estrogen-replacement therapy on clitoral-cavernosal tissue in oophorectomized rats: a histo-quantitative study by image analyzer. Urol Res 2001;29(5):317-2.
- O'Connell HE, Hutson JM, Anderson CR and Plenter RJ: Anatomical relationship between urethra and clitoris. J Urol 1998;159:1892-7.
- O'Connell HE, Sanjeevan KV and Hutson JM: Anatomy of the clitoris. J Urol 2005;174:1189-1195.
- Baggish MS, Steele AC and Karram M: The relationships of the vestibular bulb and corpora cavernosa to the female urethra: a microanatomic study. II. J Gynecol Surg 1999;15:171.
- Toesca A, Stolfi VM and Cocchia D: Immunohistochemical study of the corpora cavernosa of the human clitoris. J Anat 1996;188:513.
- Burnett AL, Calvin DC, Silver RL, Peppas DS and Docimo SG: Immunohistochemical description of nitric oxide synthase isoforms in human clitoris. J Urol 1997;158:75-8.
- Alguacil NM, Pfaff DW, Shelley DN and Schober JM: Clitoral sexual arousal: an immunocytochemical and innervation study of the clitoris. BJU International 2008;101,1407-1413.

19. Deliganis AV, Maravilla KR, Heiman JR, Carter WO, Garland PA, Peterson BT et al.: Female genitalia: dynamic MR imaging with use of MS-325: initial experiences evaluating female sexual response. *Radiology*, 2002;225:791-9.
20. Suh DD, Yang CC, Cao Y, Garland PA and Maravilla KR: Magnetic resonance imaging anatomy of the female genitalia in premenopausal and postmenopausal women. *J Urol* 2003;170:138-44.
21. Maravilla KR, Yang CC: Magnetic resonance imaging and the female sexual response: overview of techniques, results, and future directions. *J Sex Med*, 2008;5(7):1559-71.
22. Yucel S, De Souza A Jr and Baskin LS: Neuroanatomy of the human female lower urogenital tract. *J Urol* 2004;172:191-5.
23. Yang CC, Cold CJ, Yilmaz U and Maravilla KR: Sexually responsive vascular tissue of the vulva. *BJU International* 2005;97:766-772.
24. Baskin LS, Erol A, Li YM, Liu WH, Kurzrock E and Cunha GR: Anatomical studies of the human clitoris. *J Urol*, 1999;162:1015-20.
25. O'Connell HE, DeLancey JO: Clitoral anatomy in nulliparous, healthy, premenopausal volunteers using unenhanced magnetic resonance imaging. *J Urol* 2005;173:2060-3.
26. Goldstein MK and Teng NN: Gynecologic factors in sexual dysfunction of the older women. *Clin Geriatr Med* 1991;7:41.
27. Bachmann GA: Sexual function in the perimenopause. *Ob Gyn Clin North Amer* 1993;20:379.
28. Tarcan T, Park K, Goldstein I, Maio G, Fassina A, Krane RJ and Azadzi KM: Histomorphometric analysis of age related structural changes in human clitoral cavernosal tissue. *J Urol* 1999;161:940-4.
29. Caruso S, Rugolo S, Mirabella D, Intelisano G, Di Mari L, Cianci A: Changes in clitoral blood flow in premenopausal women affected by type 1 diabetes after single 100-mg administration of sildenafil. *Urology* 2006;68:161-165.
30. Caruso S, Rugolo S, Agnello C, Intelisano G, Di Mari L, Cianci A: Sildenafil improves sexual functioning in premenopausal women with type 1 diabetes who are affected by sexual arousal disorders: a double-blind, cross-over, placebo-controlled pilot study. *Fertil Steril* 2006;85:1496-1501.
31. Enzlin P, Mathieu C, Vanderschueren D and Demyttenaere K: Diabetes mellitus and female sexuality: a review of 25 years' research. *Diabet Med*, 1998;15:809.
32. Meeking DR, Fosbury JA, Cummings MH, Alexander WD, Shaw KM and Russell-Jones DL: Sexual dysfunction and sexual health concerns in women with diabetes. *Sex Dysfunct* 1998;1:83.
33. Park K, Goldstein I, Andry C, Siroky MB, Krane RJ and Azadzi KM: Vasculogenic female sexual dysfunction: the hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. *Int. J. Impotence Res*, 1997;9:27.
34. Azadzi KM, Park KS, Andry C, Goldstein I and Siroky MB: Relationship between cavernosal ischemia and corporal veno-occlusive dysfunction in an animal model. *J. Urol*, 1997;167:1011.
35. Park K, Tarcan T, Goldstein I, Siroky MB, Krane RJ and Azadzi KM: Atherosclerosis-induced chronic arterial insufficiency causes clitoral cavernosal fibrosis in the rabbit. *Int Impot Res*, 2000;12:11-16.
36. Park K, Ryu SB and Park YI: Diabetes mellitus induces vaginal tissue fibrosis by TGF- β 1 expression in the rat model. *J Sex Marital Ther*, 2001; 27:577-87.
37. Gupta S, Moreland RB, Pabby A, Goldstein I and Nehra A: Diabetes-induced structural changes in rabbit corpus cavernosum. *Int J Impotence Res*, 1996; abstract D55, 8:136.
38. Park K, Ahn K, Chang JS, Lee SE, Ryu SB and Park YI: Diabetes induced alteration of clitoral hemodynamics and structure in the rabbit. *J Urol*, 2002;168,1269-1272.