



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU EM CIÊNCIAS
MÉDICO-CIRÚRGICAS

BRUNO LIMA LINHARES

EFEITO DO INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE TIPO 4 NA RECUPERAÇÃO
DA FUNÇÃO ERÉTIL E REGENERAÇÃO NERVOSA APÓS LESÃO DO
NERVO CAVERNOSO EM RATOS

FORTALEZA

2023

BRUNO LIMA LINHARES

EFEITO DO INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE TIPO 4 NA RECUPERAÇÃO DA
FUNÇÃO ERÉTIL E REGENERAÇÃO NERVOSA APÓS LESÃO DO NERVO
CAVERNOSO EM RATOS

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo de Paula Miranda

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L728e Linhares, Bruno Lima.

Efeito do inibidor da fosfodiesterase tipo 4 na recuperação da função erétil e regeneração nervosa após lesão do nervo cavernoso em ratos / Bruno Lima Linhares. – 2023.
63 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira.

Coorientação: Prof. Dr. Eduardo de Paula Miranda.

1. Disfunção Erétil. 2. Inibidores de Fosfodiesterase. 3. Lesão por Esmagamento. 4. Ratos. I. Título.
CDD 617

BRUNO LIMA LINHARES

EFEITO DO INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE TIPO 4 NA RECUPERAÇÃO DA
FUNÇÃO ERÉTIL E REGENERAÇÃO NERVOSA APÓS LESÃO DO NERVO
CAVERNOSO EM RATOS

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovado em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Eduardo de Paula Miranda
Centro Universitário Christus – Unichristus

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. José de Bessa Júnior
Universidade Estadual de Feira de Santana

A Deus,
À minha esposa Anna Renée,
Aos meus filhos, Gabriel e Lara.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar.

À minha esposa Anna Renée, minha companheira e amiga, pelo apoio incondicional, pela paciência e compreensão.

Aos meus filhos, Gabriel e Lara, razão maior da minha vida, pela paciência e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao Prof. Dr. José Alberto Dias Leite, coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Médico-cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, pela incansável dedicação à pós-graduação desta instituição.

Ao Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira, professor do Departamento de Cirurgia e meu orientador, pelos ensinamentos, imensurável apoio, pela oportunidade e confiança.

Ao Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento, professor da Universidade Estadual do Ceará, pela confiança e apoio, por ter me acolhido e acreditado em mim desde o mestrado, pela imensurável ajuda na realização dos experimentos e interpretação dos resultados.

Ao Prof. Dr. Eduardo de Paula Miranda, meu coorientador e grande amigo, pelo exemplo, pela paciência, pelos inúmeros ensinamentos e pelo apoio incondicional durante esses anos de muito trabalho.

À Profa. Dra. Cláudia Ferreira Santos, professora da Universidade Estadual do Ceará, pela valiosa ajuda na realização dos experimentos e pelos ensinamentos durante as atividades de laboratório.

Ao Prof. Dr. Rafael de Moraes Campos, pelo essencial apoio, ensinamentos, pela disponibilidade e pela imensurável ajuda na realização dos experimentos e interpretação dos resultados.

Ao Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora, pelos ensinamentos e pela imensurável ajuda na avaliação patológica e análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. José de Bessa Júnior, pelos ensinamentos e ajuda na análise e interpretação dos resultados.

À minha amiga e colega de doutorado, Dra. Ariana Gomes da Silva, por todo o apoio, disponibilidade e indispensável ajuda na realização dos experimentos.

Ao colega urologista e amigo, Bruno Hallan, pela ajuda na realização dos experimentos e apoio na discussão dos resultados.

Ao estudante da graduação da FAMED/UFC Matheus Januário da Silva, pelo auxílio durante a realização dos experimentos e cuidado com os animais.

À equipe do laboratório de patologia, sobretudo à Dra. Juliana Cordeiro e ao mestrando Guilherme de Sousa, pelo fundamental apoio na condução da avaliação patológica.

Aos colegas de laboratório, em especial aos doutorandos Renata Santiago e Iury Paz, por todo o auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos funcionários da pós-graduação, Maria Luciene de Oliveira, Magda Fontenele e Marcelo Barbosa, pela disponibilidade e atenção com os alunos da pós-graduação.

À *International Society for Sexual Medicine* (ISSM), pelo apoio financeiro (*Zorgniotti Grant*), que viabilizou a realização deste projeto.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”
(Albert Einstein).

RESUMO

Não há consenso sobre o melhor regime de tratamento para recuperação da função erétil (FE) após a prostatectomia radical (PR). Embora muitas intervenções farmacológicas consigam melhorar a FE em ratos, ainda faltam estudos avaliando estratégias que promovam a regeneração nervosa do nervo cavernoso (NC). Os inibidores de fosfodiesterase do tipo 4 (IPDE4), como o rolipram, mostraram um efeito neuroprotetor após lesão da medula espinhal em camundongos, facilitando a recuperação funcional. Também foi sugerido que a propriedade neuroprotetora da sildenafil é provavelmente atribuída ao seu efeito na fosfodiesterase do tipo 4. Nosso objetivo foi avaliar o papel dos IPDE4 na recuperação da FE e regeneração nervosa após lesão bilateral por esmagamento do NC em ratos (LBNC). Trinta ratos Wistar machos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: (i) sham (sem lesão do NC); (ii) controle (sem tratamento após LBNC); (iii) LBNC + tadalafila; (iv) LBNC + rolipram e (v) LBNC + tadalafila + rolipram. A laparotomia inicial foi realizada e os NC foram esmagados com pinça hemostática. Os animais dos grupos (iii) e (iv) receberam respectivamente tadalafila (5mg/kg/dia) e rolipram (1mg/kg/dia), via oral, por 14 dias. Os animais do grupo (v) receberam tadalafila + rolipram nas mesmas doses. Em seguida, os animais foram submetidos à estimulação do NC nas frequências 4, 8 e 16 Hz, com registro da pressão arterial média (PAM) e pressão intracavernosa (PIC). A FE foi representada pela medida da relação PIC máxima / PAM e área sob a curva (AUC) da PIC. O pênis e NC dos animais foram enviados para avaliação estrutural com os marcadores imuno-histoquímicos S100 e Ki-67. Na análise funcional, LBNC resultou em piora da FE quando comparado ao sham. Não foram encontradas diferenças significativas na relação PIC/PAM ao comparar os grupos (iii), (iv) ou (v) com o grupo controle. Ao considerar a AUC da PIC (AUC_{PIC}), os ratos tratados com tadalafila apresentaram melhora significativa da resposta erétil. Os animais que receberam rolipram demonstraram uma tendência de melhora da relação AUC_{PIC}/PAM em comparação ao grupo controle, mas sem diferença estatística. O grupo da tadalafila apresentou maior expressão de S100 no nervo peniano dorsal em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). O grupo do rolipram apresentou menor expressão de Ki-67 no NC em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). No modelo experimental, rolipram não melhorou a resposta erétil após lesão do NC em ratos. Estudos adicionais são necessários para avaliar o real papel dos IPDE4 na regeneração nervosa após lesão do NC e seu potencial terapêutico na disfunção erétil pós-PR.

Palavras-chave: Disfunção Erétil; Inibidores de Fosfodiesterase; Lesão por Esmagamento; Ratos.

ABSTRACT

There is no consensus on the best treatment regimen for recovery of erectile function (EF) after radical prostatectomy (RP). Although many pharmacological interventions can improve EF in rats, there is still a lack of studies evaluating strategies that promote nerve regeneration of the cavernous nerve (CN). Phosphodiesterase type 4 inhibitors (IPDE4), such as rolipram, have shown a neuroprotective effect after spinal cord injury in mice, facilitating functional recovery. It has also been suggested that the neuroprotective property of sildenafil is probably attributed to its effect on phosphodiesterase type 4. Our aim was to evaluate the role of IPDE4 in EF recovery and nerve regeneration after bilateral CN crush injury in rats (BCNI). Thirty male Wistar rats were randomly divided into four groups: (i) sham (no CN lesion); (ii) control (no treatment after BCNI); (iii) BCNI + tadalafil; (iv) BCNI + rolipram and (v) BCNI + tadalafil + rolipram. The initial laparotomy was performed and the CN were crushed with a hemostatic clamp. The animals in groups (iii) and (iv) received tadalafil (5mg/kg/d) or rolipram (1mg/kg/d) orally for 14 days, respectively. The animals in group (v) received tadalafil + rolipram at the same doses. Then, the animals were submitted to CN stimulation at frequencies 4, 8 and 16 Hz, with recording of mean arterial pressure (MAP) and intracavernosal pressure (ICP). EF was represented by the measurement of maximum ICP normalized to MAP (ICP/MAP ratio) and total normalized area under the curve (AUC) of ICP. The penis and CN of the animals were sent for structural evaluation with the immunohistochemical markers S100 and Ki-67. In the functional analysis, BCNI resulted in worse EF when compared to sham. No significant differences were found in the ICP/MAP ratio when comparing groups (iii), (iv) or (v) with the control group. When considering AUC of ICP (AUC_{ICP}), the rats treated with tadalafil showed a significant improvement in the EF. The animals that received rolipram showed a trend towards an improvement in the AUC_{ICP}/MAP ratio compared to the control group, but the difference did not reach statistical significance. The tadalafil group had a higher expression of S100 in the dorsal penile nerve compared to the control group ($p < 0.05$). The rolipram group had a lower expression of Ki-67 in the CN compared to the control group ($p < 0.05$). In the experimental model, rolipram did not improve erectile response after CN injury in rats. Additional studies are needed to evaluate the role of IPDE4 in nerve regeneration after CN injury and their therapeutic potential in post-RP erectile dysfunction.

Keywords: Erectile Dysfunction; Phosphodiesterase Inhibitors; Crush Injuries; Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Anatomia e fisiologia da ereção peniana. Fortaleza, 2023.....	22
Figura 2 - Esquema ilustrando as 11 isoenzimas de fosfodiesterase e suas diferentes afinidades pelos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc. Fortaleza, 2023.....	25
Figura 3 - Relaxamento do músculo liso do pênis e corte transversal dos corpos cavernosos. Fortaleza, 2023.	27
Figura 4 - Posição anatômica do gânglio pélvico maior e do nervo cavernoso no rato. Fortaleza, 2023.	32
Figura 5 - Dissecção do nervo cavernoso para posterior esmagamento (primeira cirurgia). Fortaleza, 2023.	36
Figura 6 - Punção da crura peniana e posicionamento dos eletrodos para eletroestimulação. Fortaleza, 2023.....	38
Figura 7 - Estimulador elétrico (Grass S48) utilizado durante os experimentos, com os parâmetros de estimulação ajustados. Fortaleza, 2023.	38
Figura 8 - Resumo do protocolo experimental. Fortaleza, 2023.....	40
Figura 9 - Experimento do grupo sham (i). Fortaleza, 2023.....	43
Figura 10 - Experimento do grupo LBNC + tadalafila (iii). Fortaleza, 2023.	43
Figura 11 - Experimento do grupo LBNC + rolipram (iv). Fortaleza, 2023.....	44
Figura 12 - Marcação de S100 em um exemplo de secção transversal de corpo cavernoso para cada grupo de animais. Fortaleza, 2023.	46
Figura 13 - Marcação de S100 em um exemplo de secção transversal do nervo dorsal do pênis para cada grupo de animais. Fortaleza, 2023.....	47
Figura 14 - Exemplo de marcação com Ki-67 em lâmina de nervo cavernoso nos diferentes grupos. Fortaleza, 2023.	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - PIC obtida por estimulação do nervo cavernoso (4, 8 e 16Hz). Fortaleza, 2023.....	41
Gráfico 2 - Área sob a curva da PIC obtida por estimulação do nervo cavernoso (4, 8 e 16Hz). Fortaleza, 2023.	42
Gráfico 3 - Área percentual (%) de expressão de S100 no corpo cavernoso do pênis. Fortaleza, 2023.	45
Gráfico 4 - Área percentual (%) de expressão de S100 no nervo dorsal do pênis. Fortaleza, 2023.	46
Gráfico 5 - Área percentual (%) de expressão de Ki-67 no nervo cavernoso. Fortaleza, 2023.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato ciclase
AMPc	Adenosina de monofosfato cíclico
ANOVA	Análise da variância (do inglês Analysis of Variance)
AUC	Área sob a curva
CaP	Câncer de Próstata
CD31	Cluster de diferenciação 31
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
DE	Disfunção erétil
DMSO	Dimetil sulfóxido
DP	Desvio-padrão
EUA	Estados Unidos da América
FE	Função erétil
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Guanosina de monofosfato cíclico
GPM	Gânglio pélvico maior
GTP	Guanosina trifosfato
HIF-1a	Fator induzido por hipóxia 1-a
IIC	Injeção intracavernosa
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPDE	Inibidor de fosfodiesterase
IPDE4	Inibidor de fosfodiesterase tipo 4
IPDE5	Inibidor de fosfodiesterase tipo 5
KCl	Cloreto de potássio
LBNC	Lesão bilateral do nervo cavernoso
LNC	Lesão do nervo cavernoso
NANC	Fibras nervosas não-adrenérgicas não-colinérgicas
NC	Nervo cavernoso
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial

iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
PAM	Pressão arterial média
PDE	Fosfodiesterase
PGE1	Prostaglandina E1
PIC	Pressão intracavernosa
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
PR	Prostatectomia radical
PSA	Antígeno Prostático Específico
SEM	Erro padrão da média
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador beta 1
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SÍMBOLOS

g	gramas
Kg	Quilogramas
mg	Miligramas
L/h	Litros por hora
°C	Graus Celsius
mm	Milímetros
UI/kg	Unidades internacionales por kilograma
UI/mL	Unidades internacionales por mililitro
%	Percentual
G	Gauge
mA	Miliamperes
Hz	Hertz
μm	Micrometros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Fisiologia da ereção e definição de disfunção erétil	20
1.2 Mecanismos da disfunção erétil secundária à PR	22
1.3 Conceito de reabilitação peniana.....	24
1.4 Inibidores de fosfodiesterases	24
1.5 Inibidores da fosfodiesterase tipo 5.....	26
1.6 Controvérsias nos benefícios da reabilitação peniana.....	27
1.7 IPDE4 e sua utilização em reabilitação peniana	29
1.8 Modelos experimentais em DE pós-PR	31
2 JUSTIFICATIVA.....	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Modelo animal	35
4.2 Desenho experimental.....	35
4.2.1. Lesão do nervo cavernoso	36
4.2.2. Estimulação do NC e avaliação da resposta erétil.....	37
4.3 Histologia e imuno-histoquímica	40
4.4 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Avaliação funcional (hemodinâmica erétil)	41
5.2 Avaliação estrutural (análise imuno-histoquímica).....	44
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO A – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	63

1 INTRODUÇÃO

De acordo com uma recente estimativa que englobou dados de 185 diferentes países, excluindo-se os tumores de pele não-melanoma, o câncer de próstata (CaP) é o segundo câncer mais frequente e a quinta causa de morte por câncer entre os homens (SUNG et al., 2021). Foi a neoplasia maligna diagnosticada com mais frequência na população masculina em mais da metade (112 de 185) dos países incluídos (SUNG et al., 2021). Em uma estimativa ainda mais recente dos Estados Unidos da América (EUA), somente o CaP foi responsável por 27% de todos os diagnósticos de neoplasia maligna entre os homens desse país (SIEGEL et al., 2022). No Brasil, segundo os últimos dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram estimados 71.730 novos casos de CaP para o ano de 2022, o que corresponde a 30% de todos os casos de câncer diagnosticados na população masculina brasileira (excluindo-se os tumores de pele não-melanoma) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022).

O tratamento de referência para câncer de próstata localizado em pacientes com expectativa de vida de pelo menos 10 anos é a prostatectomia radical (PR), a qual pode ser empregada também em casos de doença localmente avançada. Constitui uma das cirurgias oncológicas mais realizadas em todo o mundo (AOUN et al., 2015).

Devido à localização anatômica dos órgãos sexuais e suas inervações, a PR é associada à disfunção sexual em homens. Disfunção erétil (DE), encurtamento peniano, curvatura do pênis, distúrbios do orgasmo e da ejaculação, entre outras, são exemplos de consequências negativas desse tratamento oncológico na função sexual dos pacientes (SALONI et al., 2012). Com o advento do antígeno prostático específico (PSA), o CaP tem sido diagnosticado cada vez mais precocemente em homens cada vez mais jovens, de tal forma que a maioria dos pacientes submetidos à PR tem razoável função erétil (FE) pré-operatória e elevadas expectativas quanto à sua preservação (BOORJIAN et al., 2012).

Nos últimos vinte anos, os resultados funcionais ganharam especial importância e se tornaram um meio utilizado para medir o sucesso do procedimento cirúrgico (BORREGALES et al., 2013; LIMA et al., 2021). Apesar dos inquestionáveis avanços na técnica cirúrgica, através da disseminação de técnicas minimamente invasivas, seja por via laparoscópica ou assistida por robô, a disfunção erétil continua sendo uma complicação comum, com taxas de prevalência variando de 20 a 90% (LIMA

et al., 2021; MULHALL, 2009). Essa grande discrepância é resultado de populações heterogêneas de pacientes e diferentes definições de DE utilizadas nos estudos (MIRANDA et al., 2021). Alguns estudos postulam que a prevalência de DE após prostatectomia radical assistida por robô aos 12 e 24 meses de pós-operatório varia de 10 a 46% e de 6 a 37%, respectivamente (FICARRA et al., 2012; KIM et al., 2011; LIMA et al., 2021). Em comparação, a incidência de DE após prostatectomia radical retropúbica (técnica aberta) varia de 14 a 82%, considerando diferentes períodos de tempo de pós-operatório (CATALONA et al., 1999; DUBBELLMAN et al., 2006; KUNDU et al., 2004). De acordo com as evidências atuais, não há comprovação de superioridade de qualquer técnica cirúrgica em relação às demais quanto ao desfecho de preservação de função erétil (LIMA et al., 2021).

A DE secundária à PR é um determinante independente de pior qualidade de vida geral dois anos após o tratamento para CaP (PENSON et al., 2003). DE está associada à baixa produtividade no trabalho, perda da autoestima e depressão. Diversos estudos demonstraram que tratamentos para recuperação da FE tem impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes e casais (TELOKEN et al., 2009). Apesar de a PR apresentar resultados oncológicos excelentes a curto prazo, a preservação e reabilitação da FE permanece um desafio. Considerando a alta incidência de CaP e o aumento da sobrevida dos pacientes, esse problema afeta um número substancial de homens (DELONGCHAMPS et al., 2006; MARTÍNEZ-SALAMANCA et al., 2016). Acredita-se que cerca de 10% de todos os casos de DE sejam consequência da PR (AOUN et al., 2015).

1.1 Fisiologia da ereção e definição de disfunção erétil

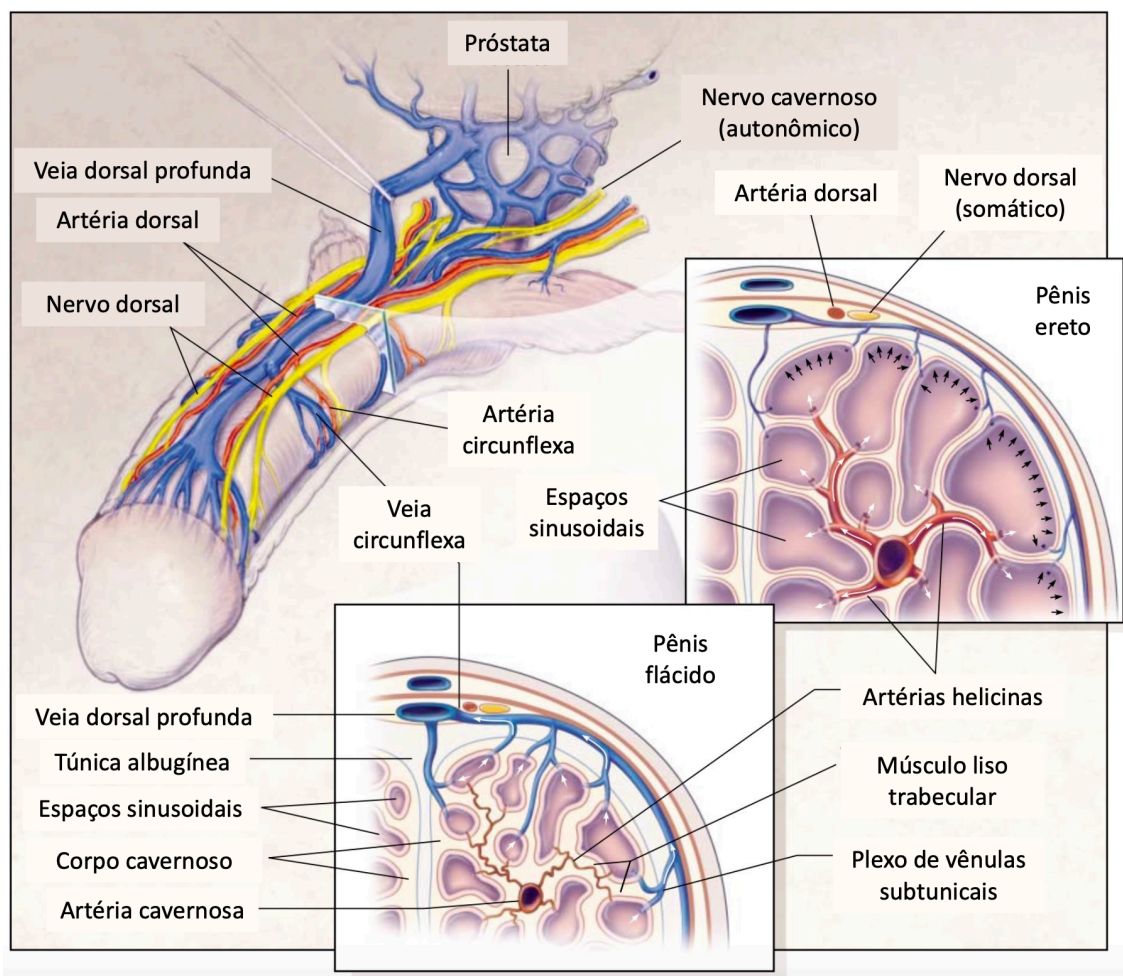
Do ponto de vista biológico, a ereção é um processo complexo que envolve o funcionamento adequado de múltiplos sistemas e órgãos. Em sua essência, a ereção e detumescência penianas são fenômenos hemodinâmicos controlados por estímulos neuronais, com a musculatura lisa cavernosa desempenhando um papel vital. O estímulo sexual e o aumento da atividade parassimpática levam à vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo, causando aumento da pressão intracavernosa (MELMAN; GINGELL, 1999).

De forma mais detalhada, a ereção peniana é um evento neurovascular modulado por fatores psicológicos e eixo hormonal. Na estimulação sexual, os impulsos nervosos causam a liberação de neurotransmissores dos terminais do nervo cavernoso e

de fatores relaxantes das células endoteliais do pênis, resultando no relaxamento do músculo liso nas artérias e arteríolas que suprem o tecido erétil e, por conseguinte, em um considerável aumento do fluxo sanguíneo peniano. Ao mesmo tempo, o relaxamento do músculo liso trabecular aumenta a complacência dos sinusóides, facilitando o enchimento rápido e a expansão do sistema sinusoidal (figura 1). Os plexos venulares subtunicais são, portanto, comprimidos entre as trabéculas e a túnica albugínea, resultando em oclusão quase total do fluxo venoso (BANYA et al., 1989; FOURNIER et al., 1987; LUE, 2000). Esses eventos aprisionam o sangue dentro dos corpos cavernosos e elevam o pênis de uma posição pendente para uma posição ereta, com uma pressão intracavernosa de aproximadamente 100mmHg (fase de ereção completa) (LUE, 2000).

A disfunção erétil é definida como a incapacidade persistente de obtenção e manutenção de ereção suficiente para uma função sexual satisfatória (NIH, 1993). Devido à elevada prevalência, trata-se da disfunção sexual mais estudada em homens (UCKERT et al., 2007). A DE é uma entidade complexa e está associada a várias comorbidades, incluindo fatores psicológicos, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, síndrome metabólica e tabagismo, além do processo de envelhecimento natural (ALBERSEN et al., 2010). Um estudo recente que incluiu indivíduos de oito países estimou uma prevalência global de disfunção erétil de cerca de 45% em pacientes entre 40 e 70 anos (GOLDSTEIN et al., 2020). A DE é claramente dependente da idade, com um aumento acentuado da prevalência a partir da quinta década de vida (PORST et al., 2013).

Figura 1 - Anatomia e fisiologia da ereção peniana. Fortaleza, 2023.



Fonte: Lue (2000).

Nota: Os nervos cavernosos (autônomos) cursam posterolateralmente à próstata e entram nos corpos cavernosos e no corpo esponjoso para regular o fluxo sanguíneo peniano durante a ereção e a detumescência. Os nervos dorsais (somáticos), ramos dos nervos pudendos, são os principais responsáveis pela sensação peniana. Os mecanismos de ereção e flacidez são mostrados nas inserções superior e inferior da figura, respectivamente. Durante a ereção, o relaxamento do músculo liso trabecular e a vasodilatação das arteríolas resultam em um aumento significativo do fluxo sanguíneo, que expande os espaços sinusoidais para alongar e aumentar o pênis. A expansão dos sinusóides comprime o plexo de vênulas subtunicais contra a túnica albugínea. Além disso, o estiramento da túnica comprime as veias emissárias, reduzindo ao mínimo o escoamento de sangue. No estado flácido, o influxo através das artérias helicinas constrictas e tortuosas é mínimo, e há escoamento livre através do plexo de vênulas subtunicais.

1.2 Mecanismos da disfunção erétil secundária à PR

A DE após PR é sabidamente multifatorial, porém a lesão nervosa iatrogênica durante o procedimento é o principal responsável pelo acometimento imediato da FE (SEGAL; BURNETT, 2011). Apesar do advento de técnicas intraoperatórias de preservação nervosa durante a PR, uma percentagem significativa de homens continua a sofrer com DE após esta operação. A manipulação cirúrgica por si só do delicado complexo de fibras autonômicas que envolve o nervo cavernoso pode gerar uma perda de função transitória mesmo nos casos em que o nervo tenha sido deliberadamente preservado. Geralmente essa manipulação gera uma lesão nervosa conhecida como neuropraxia, que é ocasionada pela tração excessiva, lesão térmica ou processo inflamatório decorrente da cauterização e dissecação tecidual durante a remoção da próstata, o que ocorre mesmo nas mãos de cirurgiões experientes. Nesses casos, a recuperação da função erétil devido à neuropraxia pode demorar até 24 meses (MONTORSI et al., 1997). Assim, acredita-se que essa lesão nervosa temporária possa induzir hipóxia no corpo cavernoso, que por sua vez leva a uma desorganização estrutural do tecido erétil, com aumento da produção de colágeno, remodelação venosa e consequente diminuição de músculo liso (IACONO et al., 2005; GONZALEZ-CADAVID, 2009; MORELAND, 1998). Em última análise, tal processo degenerativo pode levar à disfunção veno-oclusiva dos corpos cavernosos, também conhecida como fuga venosa (NEHRA et al., 1996).

Estudos experimentais têm demonstrado sistematicamente que o dano ao nervo cavernoso leva à diminuição das células musculares lisas e fibrose do corpo cavernoso (IACONO et al., 2005; MULHALL et al., 2008; WEYNE et al., 2015). Diferentes mecanismos têm sido associados a esse desfecho, dentre eles: aumento da expressão de fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), que por sua vez leva ao aumento da expressão de colágeno I e III e alterações na relação músculo liso/colágeno; aumento na concentração do fator induzido por hipóxia 1-a (HIF-1a) e ativação de apoptose no músculo liso do tecido cavernoso (WEYNE et al., 2015). Um estudo em ratos demonstrou que a apoptose das células musculares lisas se inicia já no primeiro dia após neurectomia cavernosa tanto bilateral como unilateral (LEUNGWATTANAKIJ et al., 2003). Tal apoptose do músculo liso parece estar concentrada abaixo da túnica albugínea, o que pode gerar fuga venosa quando o conteúdo de músculo liso no pênis atinge níveis inferiores a 40% (NEHRA et al., 1996).

1.3 Conceito de reabilitação peniana

Historicamente, os pacientes que apresentavam DE pós-PR eram apenas observados e encorajados a esperar pelo retorno da FE, sem a necessidade de intervenção ativa. Os resultados de tal abordagem eram frustrantes para os pacientes e também para os profissionais que os assistiam (AOUN et al., 2015).

O termo reabilitação peniana foi sugerido pela primeira vez por Montorsi et al. (1997) e envolve um conjunto de intervenções que visam maximizar as chances de retorno à FE pré-operatória e encurtar o intervalo de tempo para que isso ocorra (MONTORSI et al., 1997). Como já mencionado, acredita-se que a perda das ereções diárias e noturnas durante o período de neuropraxia possa levar à hipóxia e apoptose corporal peniana com subsequente atrofia do pênis (HAKKY et al., 2014). Assim, foi proposto que uma intervenção precoce que restabeleça ereções regulares com auxílio farmacológico e promova uma oxigenação adequada do pênis seja capaz de intervir nesse ciclo vicioso e prevenir muitos dos efeitos deletérios ao tecido erétil (HAKKY et al., 2014).

1.4 Inibidores de fosfodiesterases

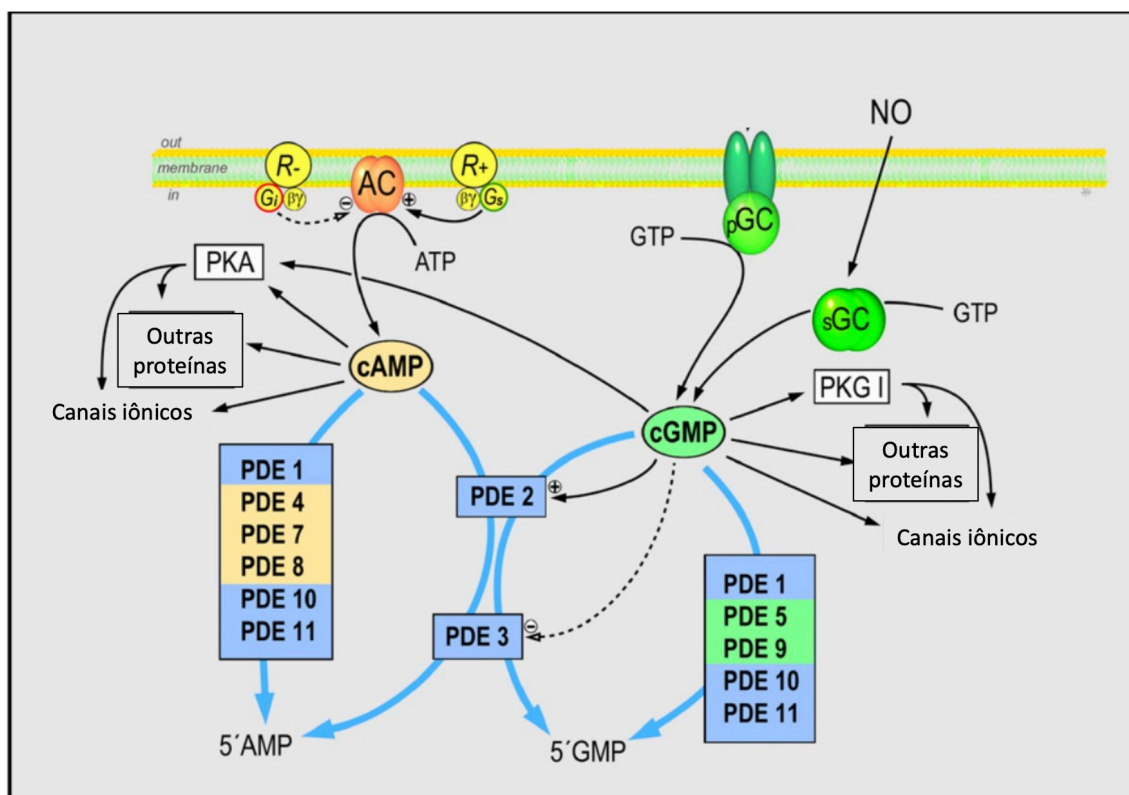
Fosfodiesterases são enzimas que metabolizam as moléculas dos segundos mensageiros adenosina de monofosfato cíclico (AMPc) e guanosina de monofosfato cíclico (GMPc). São geradas a partir de 21 genes em mamíferos e divididas em 11 famílias baseadas nas suas sequências proteicas, catalíticas e sensibilidade aos inibidores, tal como sua afinidade ao AMPc ou GMPc (figura 2). Atualmente, existem inibidores para cada família; no entanto, muitos dos inibidores atuam em mais de uma isoenzima, podendo apresentar diferente sensibilidade para cada uma delas (ANDERSSON et al., 2011). Das 11 isoenzimas, seis apresentam importância farmacológica (PDE 1, 2, 3, 4, 5 e 11) (UCKERT et al., 2006). Fosfodiesterases tipos 1, 2, 3, 10 e 11 hidrolisam ambos AMPc e GMPc. Fosfodiesterases tipos 4, 7, e 8 hidrolisam AMPc. Fosfodiesterases tipos 5, 6 e 9 são específicas para GMPc. A tadalafila é um inibidor seletivo da PDE5, com muito pouca atividade sobre as outras fosfodiesterases (UCKERT et al., 2006).

O AMPc e o GMPc são os segundos mensageiros envolvidos no relaxamento do músculo liso. Eles ativam proteína-quinases, que, por sua vez, fosforilam certas proteínas e canais iônicos, resultando em (1) abertura de canais de potássio e

hiperpolarização, (2) sequestro do cálcio intracelular para o retículo endoplasmático e (3) inibição dos canais de cálcio voltagem-dependentes, bloqueando o influxo de cálcio. A consequência é a queda do cálcio livre citosólico e relaxamento do músculo liso (ANDERSSON et al., 2015).

O óxido nítrico (NO), principal neurotransmissor responsável pelo relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso, é gerado pelas enzimas de sintase endotelial e neuronal, através da conversão de L-arginina e oxigênio em L-citrulina e NO. A liberação de NO estimula a guanilato ciclase a produzir GMPc, o qual regula a fosforilação de proteínas, notadamente a proteína quinase G (PKG), e a condutividade dos canais iônicos. A sinalização é modulada em parte pela inativação do GMPc pelas fosfodiesterases (ANDERSSON et al., 2015).

Figura 2 - Esquema ilustrando as 11 isoenzimas de fosfodiesterase e suas diferentes afinidades pelos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc. Fortaleza, 2023.



Fonte: Ückert et al. (2006).

Nota: O NO interage com a guanilato ciclase solúvel (sGC) no citoplasma celular e aumenta a taxa de conversão de GTP em GMPc. R+ e R- significam receptores que estão ou não acoplados à AC. PDE, fosfodiesterase; AC, adenilato ciclase; NO, óxido nítrico; PKG I, proteína quinase G1; sGC, guanilato ciclase solúvel; PKA, proteína quinase A.

1.5 Inibidores da fosfodiesterase tipo 5

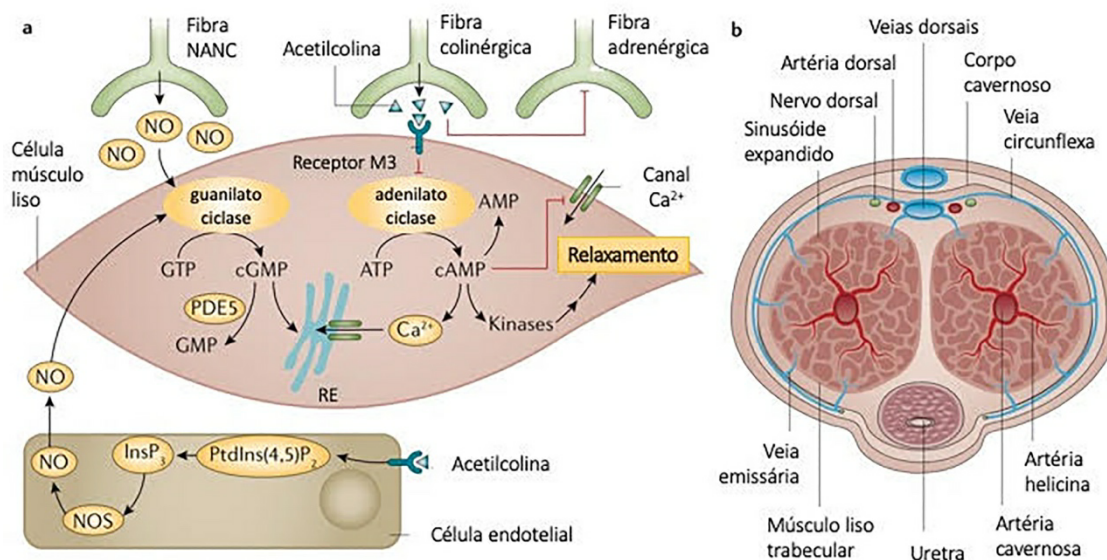
Os inibidores da fosfodiesterase 5 (IPDE5) revolucionaram o tratamento da DE e muitos estudos demonstraram benefício da sua utilização em pacientes após PR (KIM; LEE, 2015). Tal classe de fármacos tem sido a base da reabilitação peniana desde o seu lançamento, haja vista a comodidade de seu uso e o bom perfil de efeitos colaterais. Dentre os representantes dos IPDE5, podemos citar: sildenafil, vardenafil, tadalafila, entre outros. Diversos programas de reabilitação peniana já foram estabelecidos utilizando diferentes IPDE5 (TELOKEN et al., 2009). O NO é um dos responsáveis pela ereção, pois promove o relaxamento do músculo liso nas paredes dos vasos sanguíneos e no tecido erétil dentro dos corpos cavernosos (figura 3). Os IPDE5 aumentam a concentração de NO nos corpos cavernosos, uma vez que inibem a enzima fosfodiesterase específica do tipo 5, a qual degrada GMPc (TELOKEN et al., 2009).

Diversos estudos demonstraram que os IPDE5 foram capazes de melhorar a recuperação da FE após lesão do nervo cavernoso em modelos animais e em humanos. Estudos em ratos demonstraram que a terapia crônica com IPDE5 de longa e curta ação previnem a disfunção veno-oclusiva corporal e as alterações histológicas subjacentes induzidas pela neuropraxia (FERRINI et al., 2006; 2007). Além disso, foi demonstrado que o uso precoce de IPDE5 diminuiu o número de células apoptóticas no pênis após a denervação (KLEIN et al., 1997). Em uma grande série de pacientes tratados por cirurgias experientes, as taxas de recuperação de FE três anos após PR mostraram-se significativamente maiores em pacientes que utilizaram IPDE5 (73% vs. 37%; $p < 0.001$) (BRIGANTI et al., 2010).

Como a maioria dos pacientes não são capazes de obter uma ereção satisfatória em resposta aos IPDE5 durante a neuropraxia, uma vez que a liberação de NO depende de um mínimo de integridade nervosa, atribui-se parte dos efeitos positivos do sildenafil sobre o tecido erétil como decorrente da preservação endotelial promovida por essa medicação. Em um modelo experimental de lesão do nervo cavernoso por esmagamento em ratos, administração diária de sildenafil resultou em maior preservação da expressão de marcadores imuno-histoquímicos endoteliais, CD31 e óxido nítrico sintase (NOS) endotelial, quando comparada ao controle. Nesse estudo, tanto a expressão como a ativação do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) aumentam com o tratamento com sildenafil em comparação ao grupo controle (MULHALL et al., 2008). Foi ainda demonstrado que a sildenafil é capaz de ativar genes envolvidos com a preservação do

músculo liso e com a redução do estresse oxidativo, o que contribui para justificar a utilização dos IPDE5 como forma de minimizar a fibrose do corpo cavernoso após PR (LAGODA et al., 2007; SIRAD et al., 2011).

Figura 3 - Relaxamento do músculo liso do pênis e corte transversal dos corpos cavernosos. Fortaleza, 2023.



Fonte: Yafi et al. (2016).

Nota: a) Relaxamento do músculo liso do pênis. Mediante estímulo sexual, ereção normal ocorre após o óxido nítrico (NO), liberado pelas fibras nervosas não-adrenérgicas não-colinérgicas (NANC), ativar a guanilato ciclase, que, por sua vez, aumenta a concentração de GMP cíclico (GMPC), e após fibras nervosas colinérgicas parassimpáticas liberarem acetilcolina, que ativa a adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMP cíclico (AMPc). b) À medida que o músculo liso relaxa, sangue é capaz de preencher os espaços lacunares do corpo cavernoso, comprimindo as veias sub-túnicas e bloqueando o retorno venoso. Esse processo é revertido quando o cGMP é hidrolisado pela fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5). RE, retículo endoplasmático; NOS, NO sintase; Insp_3 , inositol trifosfato; $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, fosfatodilinositol 4,5 bifosfato.

1.6 Controvérsias nos benefícios da reabilitação peniana

Existem controvérsias quanto aos efeitos reais da reabilitação peniana na recuperação da FE pós-PR na prática clínica. Primeiramente o próprio mecanismo patológico é questionado, uma vez que há autores que não acreditam haver hipóxia tecidual significativa no pênis em seu estado flácido como consequência da neuropraxia (MORELAND, 1998).

Alguns estudos clínicos demonstraram resultados conflitantes. Briganti et al. (2012) não encontraram diferenças nos desfechos de recuperação da FE quando compararam pacientes que utilizaram IPDE5 diariamente ou esporadicamente

(BRIGANTI et al., 2012). Há, no entanto, várias limitações metodológicas nesses estudos clínicos. Primeiramente eles foram realizados com um número relativamente pequeno de pacientes, os quais foram acompanhados por um período inferior a 24 meses. Além disso, a evidência biológica de alterações estruturais dos corpos cavernosos através da aquisição de amostras de tecido humano é impraticável, por questões éticas óbvias. Por fim, a própria avaliação da FE, feita através de questionários validados, é subjetiva, e suas conclusões nem sempre representam os achados clínicos.

Dos três grandes estudos patrocinados pela indústria farmacêutica (MONTORSI et al., 2008; 2014; PADMAN-NATHAN et al., 2008), apenas o que utilizou sildenafil apresentou resultado positivo. Nesse estudo, quatro semanas após PR com preservação nervosa bilateral, Padma-Nathan et al. (2008) randomizaram homens com função erétil pré-operatória normal em três grupos (placebo, sildenafil 50mg e 100mg). Os autores demonstraram que a administração diária de sildenafil por 36 semanas após a cirurgia aumentou de maneira significativa o retorno de ereções espontâneas normais (PADMAN-NATHAN et al., 2008). No entanto, esse estudo apresenta restrições, como a inclusão de um pequeno número de pacientes e a falta de comparação com a utilização de IPDE5 sob demanda. Um outro estudo que avaliou a vardenafila falhou em demonstrar benefício do uso diário quando comparado ao uso sob demanda (MONTORSI et al., 2008).

Apesar de o estudo da tadalafila (MONTORSI et al., 2014) não ter alcançado seu objetivo primário, já que não houve melhora da função erétil espontânea após o término da terapia, o uso diário da droga protegeu de maneira significativa o comprimento peniano comparado ao placebo. Este achado sugere que o tratamento com dose diária de tadalafila pode contribuir para a manutenção da integridade do tecido cavernoso, considerado um fator de grande importância para a recuperação da função erétil a longo prazo (MONTORSI et al., 2014).

Embora existam muitos estudos experimentais apontando para a eficácia dos IPDE5 na reabilitação peniana, não há ainda evidência clínica contundente e irrefutável dos benefícios desse programa em humanos. Não há também comprovação definitiva indicando a melhor estratégia de tratamento para um programa de reabilitação peniana usando IPDE5 (HATZIMOURATIDIS et al., 2009). Estima-se que apenas 15% de todos os pacientes respondem aos IPDE5 nos primeiros meses após PR (FERRINI et al., 2007).

Uma outra modalidade de tratamento de DE, as injeções intracavernosas (IIC) de medicações erectogênicas, tem sido pouco investigada no contexto da reabilitação

peniana, com poucos estudos observacionais e pequenos ensaios clínicos disponíveis na literatura, realizados principalmente no período anterior ao lançamento dos IPDE5. Em um estudo antigo e com um pequeno número de pacientes, Montorsi et al. (1997) randomizaram 30 indivíduos para receber IIC ou nenhum tratamento, e aqueles no braço de tratamento tiveram melhor recuperação das ereções espontâneas seis meses após a PR. Um estudo recente, randomizado e bem desenhado, tentou comparar três diferentes estratégias para pacientes com DE pós-PR: sildenafil sob demanda, sildenafil diária associada à sildenafil sob demanda e sildenafil diária associada à IIC (MIRANDA et al., 2021). Foi realizado com o objetivo de fornecer evidências decisivas sobre a utilidade da reabilitação peniana; no entanto, o estudo teve que ser encerrado prematuramente devido à grande dificuldade de recrutamento e altas taxas de abandono do protocolo. Um dos motivos para essas dificuldades é a aversão ao tratamento injetável por uma parcela dos pacientes. Esses resultados indicam o quão desafiador é conduzir verdadeiros estudos de reabilitação, e que provavelmente teremos que aceitar os estudos observacionais e experimentais disponíveis como base científica para continuarmos avançando no âmbito da reabilitação peniana (MIRANDA et al., 2021).

1.7 IPDE4 e sua utilização em reabilitação peniana

Como mencionado anteriormente, várias modalidades de tratamento para DE pós-PR, incluindo diferentes agentes farmacológicos e não-farmacológicos, foram estudadas, mas nenhum algoritmo de tratamento padrão ou diretriz para reabilitação peniana eficaz foi desenvolvido. A intervenção mais amplamente avaliada é o uso de inibidores da fosfodiesterase tipo 5, considerados a terapia de primeira linha para o tratamento da DE (MONTORSI et al., 2014; SALMASI et al., 2016).

Como a eficácia dos IPDE5 depende da integridade da via NO-GMPc, é evidente que os pacientes nos quais esta via está prejudicada ou defeituosa se beneficiarão muito menos dessas medicações do que a população em geral. Condições que diminuem a disponibilidade de NO incluem denervação do tecido erétil após prostatectomia radical; diabetes grave com neuropatia e disfunção endotelial; síndrome metabólica; e *downregulation* da expressão de NOS, como pode ser visto na aterosclerose, envelhecimento e hipogonadismo (ALBERSEN et al., 2010).

Pacientes com DE após PR representam um dos grupos com pior resposta aos IPDE5. Injeções intracavernosas de prostaglandina E ou outros agentes vasoativos são

uma opção terapêutica alternativa, mas a difícil aceitação das injeções causa baixa adesão. Por sua vez, o implante de prótese peniana representa o último recurso. A busca por ferramentas terapêuticas que aumentem a eficácia do tratamento oral da DE após lesão do NC representa um grande desafio (MARTÍNEZ-SALAMANCA et al., 2016).

Os modelos animais que simulam fisiologicamente a lesão do NC têm um papel importante no avanço desse campo e na melhoria da qualidade de vida desses pacientes. O modelo de lesão do NC do rato tornou-se o método de pesquisa padrão devido aos custos relativamente mais baixos (CHUNG et al., 2011; HANEY et al., 2018; MULHALL et al., 2008). Estudos anteriores usando este modelo relataram que os principais mecanismos de atuação terapêutica dos IPDE5 incluem a preservação do músculo liso peniano e integridade endotelial e a prevenção de dano tecidual associado à oxidação (FERRINI et al., 2006; HATZIMOURATIDIS et al., 2009; LAGODA et al., 2007). Existem dados *in vitro* e *in vivo* em animais que sustentam o conceito de que a hipóxia peniana secundária à lesão do NC resulta em acúmulo de colágeno, apoptose do músculo liso e fibrose devido à produção de TGF- β 1. Associadamente, a produção de prostaglandina E1 (PGE1) e AMPc, as quais suprimem a síntese de colágeno induzida por TGF- β 1, é inibida em condições de hipóxia (Leungwattanakij et al., 2003; MULLERAD et al., 2006; USER et al., 2003).

Existem muitas intervenções farmacológicas que parecem ter sucesso em melhorar a recuperação da função erétil em ratos; no entanto, ainda faltam estudos que avaliem simultaneamente a regeneração nervosa (SALMASI et al., 2016). Recentemente, mais atenção tem sido dada ao efeito direto dos IPDE5 em nervos lesados. Hlaing et al. (2013) relataram que a administração de sildenafil oral após a ressecção do NC em ratos aumenta os fatores neurotróficos e tem um efeito neurorregenerativo nos principais gânglios pélvicos. Além disso, a sildenafil demonstrou proteger o sistema nervoso central de acidente vascular cerebral em modelos animais, aumentando o fluxo sanguíneo e minimizando a hipóxia (CHEN et al., 2014; ZHANG et al., 2002). Embora o mecanismo preciso responsável pelo efeito neuroprotetor dos IPDE5 permaneça incerto, estudos anteriores mostraram que provavelmente ocorre devido à ação adicional em outras fosfodiesterases, como a fosfodiesterase tipo 4 (PDE4) (SALMASI et al., 2016). No sistema nervoso, o AMPc serve como um potente sinal trófico para neurônios, controlando sua sobrevivência e diferenciação, bem como sua capacidade de direcionar e alongar axônios (RODGER et al., 2005). A PDE4 é a fosfodiesterase específica do AMP cíclico mais predominantemente expressa no tecido neural, bem como nas células imunes

(IONA et al., 2008). Verificou-se que os inibidores da fosfodiesterase tipo 4 (IPDE4), como o rolipram, têm um efeito neuroprotetor após lesão da medula espinhal em camundongos, promovendo proteção significativa do tecido, reparo anatômico e recuperação funcional (PEARSE et al., 2004). Esses resultados sugerem fortemente que o bloqueio de PDE4 pode ser eficaz na prevenção da morte de células neuronais (COSTA et al., 2013; SCHAAL et al., 2012).

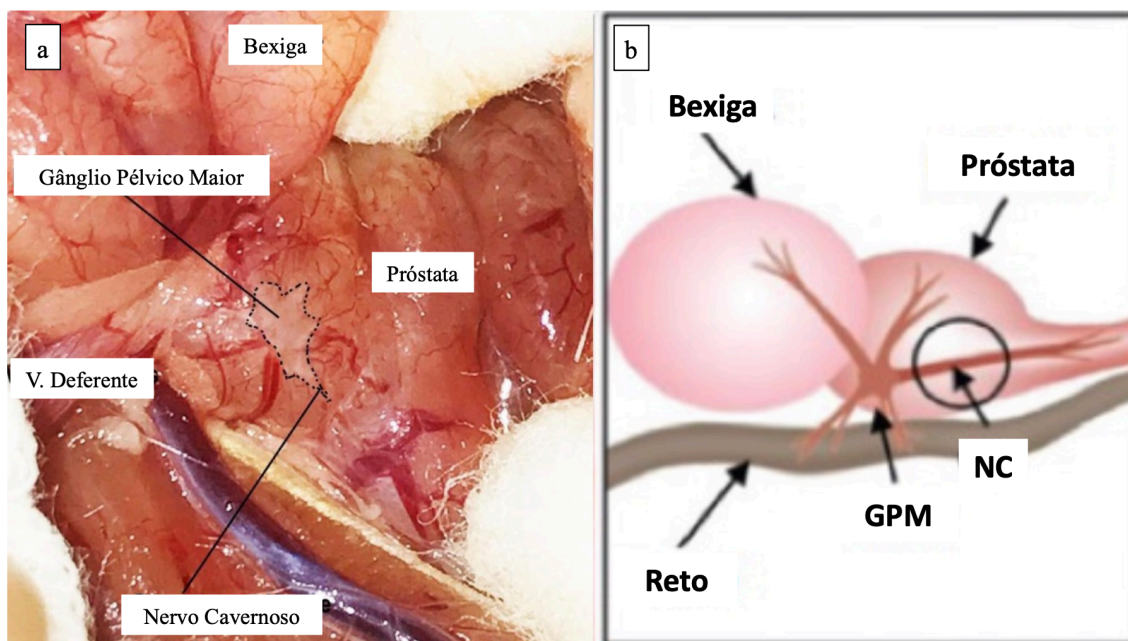
A importância da potencialização da via do AMPc através dos IPDE4 foi estudada anteriormente pelo mesmo grupo de pesquisadores do presente estudo em um outro tipo de célula muscular lisa. Em um modelo experimental de hiperatividade detrusora em camundongos, Linhares et al demonstraram que o rolipram teve um efeito relaxante em tiras de detrusor (*in vitro*) maior que a tadalafila, sugerindo que a inibição de PDE4 pode ter um papel no tratamento da bexiga hiperativa (LINHARES et al., 2018).

1.8 Modelos experimentais em DE pós-PR

Já foi demonstrado que modelos experimentais representam de maneira eficaz a DE neurogênica resultante da PR. Eles oferecem uma excelente oportunidade para avançar no entendimento da fisiopatologia e possível eficácia de diferentes tratamentos (CELLEK et al., 2012). Quinlan et al. (1989) foram os primeiros a identificar os nervos cavernosos em ratos, cuja estimulação elétrica era capaz de promover ereção. Tornou-se possível então avaliar o efeito da lesão desses nervos no corpo cavernoso, simulando condições semelhantes às que ocorrem após a PR. Pelo baixo custo, fácil manuseio e semelhança estrutural com o corpo cavernoso humano, este modelo tornou-se um dos mais utilizados para estudo de DE pós-PR. Haney et al. (2017), em seu artigo de revisão, elenca diferentes terapias para DE pós-PR já investigadas através desse modelo: drogas imunomoduladoras, fatores de crescimento, inibidores da via da rho-kinase, IPDE5, drogas anti-inflamatórias e anti-fibróticas.

Dissecções anatômicas demonstraram a existência de um gânglio em cada lado da próstata, chamado gânglio pélvico maior (GPM). Esses gânglios recebem ramos dos nervos pélvicos e hipogástricos e inervam as vísceras pélvicas. Um ramo mais largo, que emerge do GPM e cursa ao longo da uretra para inervar os corpos cavernosos, constitui o nervo cavernoso (PAN et al., 2018), como demonstrado na figura 4.

Figura 4 - Posição anatômica do gânglio pélvico maior e do nervo cavernoso no rato. Fortaleza, 2023.



Fonte: Pan et al. (2018).

Nota: a) Posição anatômica do GPM e do NC. Conforme mostrado na figura, o GPM está localizado na borda lateral da próstata. O NC em um rato é um nervo distinto que se estende do GPM. b) Desenho esquemático das relações anatômicas do nervo cavernoso em ratos. GPM, Gânglio pélvico maior; NC, nervo cavernoso.

Dentre os diferentes métodos de lesão do nervo cavernoso (LNC), a lesão por esmagamento mostrou-se a mais representativa da neuropraxia que ocorre após PR com preservação de nervos, uma vez que simula a manipulação cirúrgica durante o intraoperatório e proporciona regeneração nervosa, o que não ocorre nas lesões por excisão (CELLEK et al., 2012; WEYNE et al., 2020). Recomenda-se também proceder a lesão bilateral e não unilateral do NC, já que pode ocorrer ramificação compensatória do nervo intacto contralateral, o que poderia confundir a interpretação dos resultados (WEYNE et al., 2020).

Este modelo de estudo funcional e estrutural do tecido erétil no rato mostrou várias vantagens em relação aos outros já existentes: o nervo cavernoso é facilmente identificado, estimulação elétrica é facilmente realizada e reproduzível, e os custos com compra e manutenção são baixos. A existência de limitações de estudo da função sexual em seres humanos, tais como a inacessibilidade a espécimes teciduais e a impossibilidade de submeter humanos a rigorosos protocolos experimentais, indica que modelos animais continuarão sendo utilizados em pesquisas futuras no campo da fisiologia da ereção (BURNETT, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

Há um crescente interesse no desenvolvimento de estratégias para melhorar a qualidade de vida de pacientes com CaP submetidos à PR. Uma vez que se acredita que o dano intraoperatório ao NC seja um dos principais responsáveis pela DE pós-PR, o uso de IPDE4 em conjunto com os IPDE5 tradicionais deve ser explorado nesses pacientes. A combinação de diferentes tipos de inibidores de fosfodiesterase pode beneficiar pacientes com DE neurogênica após PR, já que evidências emergentes de uma série de estudos *in vivo* sugerem fortemente um papel neuroprotetor dos IPDE4 via AMPc (COSTA et al., 2013; LAU et al., 2013; SCHAAL et al., 2012).

Neste estudo, pretendemos investigar o possível efeito neuroprotetor dos IPDE e sua relação com a recuperação da função erétil após lesão bilateral do NC, em um esforço para entender melhor o papel dos IPDE4 no contexto da DE pós-PR. Este estudo tem o potencial de abrir caminho para a utilização clínica dos IPDE4 e fornecer importantes dados para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos neste tipo de DE e para uma possível aplicação futura dos IPDE4 nesse contexto. Pretende-se avaliar o efeito de um inibidor da fosfodiesterase tipo 4 (rolipram) e sua associação com um inibidor da fosfodiesterase tipo 5 (tadalafila) na recuperação da função erétil após lesão bilateral do NC no modelo animal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito do rolipram (IPDE4) isolado ou associado à tadalafila (IPDE5) na recuperação da função erétil após lesão bilateral do NC no modelo animal.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o impacto funcional e estrutural no corpo cavernoso causado pela lesão bilateral do nervo cavernoso (LBNC) no modelo experimental;

- Investigar e comparar os efeitos neuroprotetor e de regeneração nervosa dos IPDE4 e IPDE5 no modelo animal de LBNC, através do marcador imuno-histoquímico S100;

- Avaliar os efeitos do IPDE4 e do IPDE5 na remodelação tecidual e proliferação celular no NC após a injúria nervosa, através do marcador imuno-histoquímico Ki-67;

- Investigar se há ação sinérgica entre os IPDE4 e IPDE5 na recuperação da função erétil após LBNC no modelo animal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo animal

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará e arquivado sob o número de protocolo CEUA 5884141218 (Anexo A). Trinta ratos Wistar machos com 12 semanas de idade e peso inicial de aproximadamente 300g foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (n = 6 por grupo). Os grupos incluíram: (i) sham (sem cirurgia); (ii) lesão bilateral do nervo cavernoso (LBNC), sem tratamento após a injúria nervosa; (iii) LBNC + tadalafila; (iv) LBNC + rolipram; (v) LBNC + tadalafila + rolipram. Os animais foram obtidos do biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração.

Animais do grupo sham foram submetidos à laparotomia e acesso cirúrgico à próstata, sem lesão dos nervos cavernosos. O grupo LBNC + tadalafila (iii) recebeu tadalafila por via oral na dose diária de 5mg/kg diluída em dimetil sulfoxido (DMSO), mesma dose utilizada por Martínez-Salamanca et al. (2016). O grupo LBNC + rolipram (iv) recebeu rolipram por via oral na dose diária de 1mg/kg diluído em DMSO, conforme estudo anterior de Schaal et al. (2012). O grupo LBNC + tadalafila + rolipram (v) recebeu ambas as drogas por via oral na mesma dose e diluição dos grupos anteriores. O grupo LBNC (sem tratamento após a lesão nervosa) e o grupo sham receberam apenas o veículo (DMSO) na mesma concentração. Drogas e produtos químicos foram adquiridos da Cayman Chemical (Ann Harbor, MI, USA).

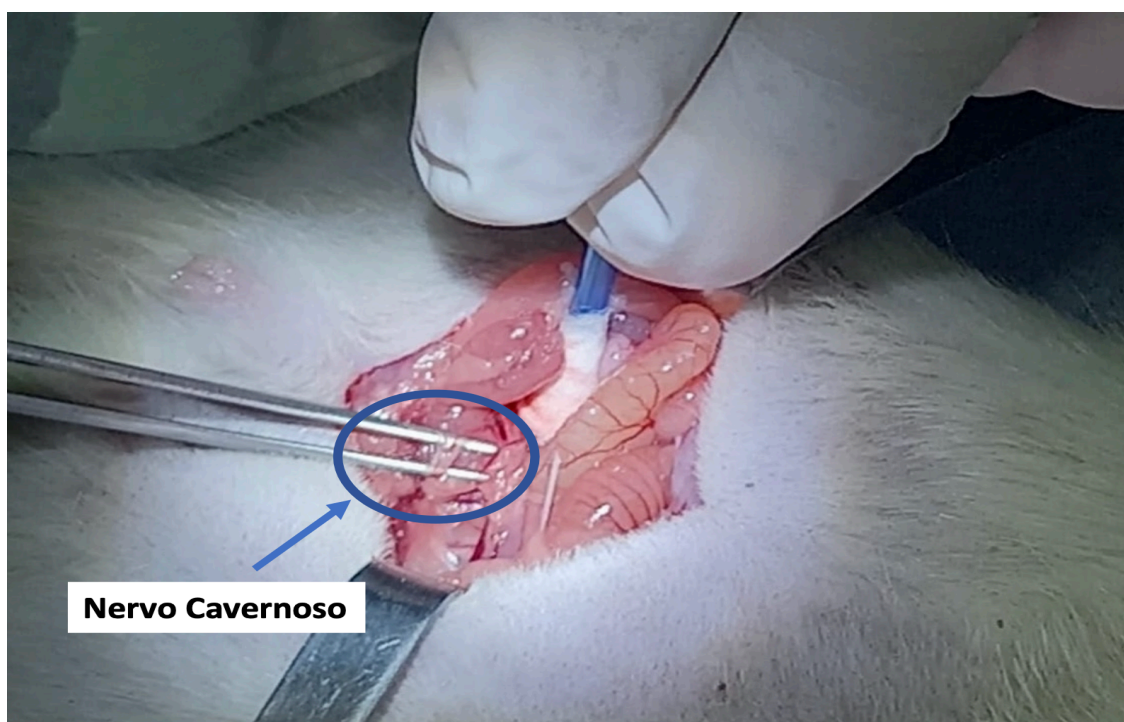
4.2 Desenho experimental

Todos os animais foram submetidos a dois procedimentos cirúrgicos: uma primeira cirurgia em que os nervos cavernosos bilaterais foram lesados (descrito abaixo), e uma segunda cirurgia em que a avaliação da resposta erétil foi obtida pela medição da pressão intracavernosa (PIC) e da pressão arterial média (PAM). O tratamento com tadalafila (grupo iii), rolipram (grupo iv), tadalafila + rolipram (grupo v) ou apenas veículo (grupos i e ii) foi iniciado no dia da primeira cirurgia, após a recuperação anestésica. Os animais foram tratados por 14 dias consecutivos, até a véspera da segunda cirurgia.

4.2.1. Lesão do nervo cavernoso

A indução anestésica foi realizada em câmara fechada com isoflurano 5%, em seguida a manutenção anestésica ocorreu por inalação de isoflurano em fluxo contínuo (2% a um fluxo de 2 L/h). Quando a profundidade adequada da anestesia foi atingida, os animais foram posicionados em posição supina em uma cama cirúrgica aquecida a 37°C. Através de uma incisão na linha média inferior de aproximadamente 2cm, o GPM na região dorsal da próstata e o NC, emanando do gânglio, foram identificados usando uma lupa de magnificação (figura 5). Os nervos cavernosos direito e esquerdo foram lesionados 5mm distalmente ao GPM: uma pinça hemostática Dumont número 7 foi aplicada ao NC por 30 segundos, removida por 30 segundos e reaplicada por mais 30 segundos. Após o procedimento acima descrito, todos os animais receberam uma única dose intraperitoneal de anti-inflamatório (meloxicam 0,8mg/kg) e antibiótico (pentabiótico 9.600 UI/kg), para redução de risco de infecção e sofrimento pós-operatórios. Em seguida, a incisão abdominal foi fechada com fio cirúrgico camada por camada. Todas as lesões do NC foram realizadas pelo mesmo investigador.

Figura 5 - Dissecção do nervo cavernoso para posterior esmagamento (primeira cirurgia). Fortaleza, 2023.



Fonte: Elaborado pelo autor.

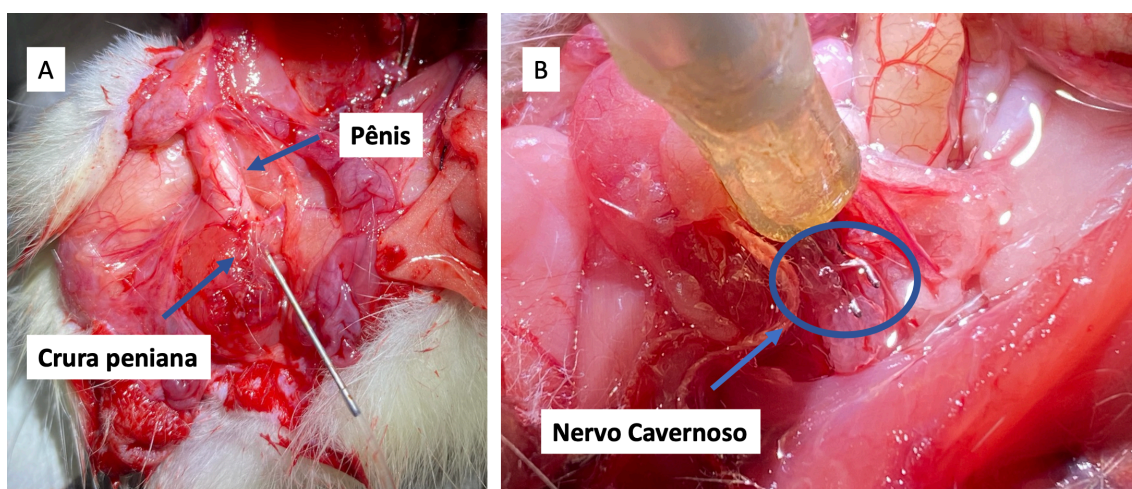
4.2.2. Estimulação do NC e avaliação da resposta erétil

Quatorze dias após a lesão do nervo, os animais foram anestesiados com isoflurano para a segunda cirurgia, conforme descrito anteriormente. A artéria carótida direita foi cateterizada com um tubo de polipropileno (PE50), contendo solução salina heparinizada (50UI/mL), conectado a um transdutor de pressão, um amplificador e sistema de aquisição de dados (PowerLab 8/30, ADInstruments, Inc, Colorado Springs, CO, EUA). Isso permitiu o registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca em um computador com o software de registro LabChart 8 (ADInstruments). Em sua junção com o arco púbico, o músculo isquiocavernoso foi seccionado, e a túnica albugínea visualizada. A medida da pressão intracavernosa (PIC) foi obtida pela inserção de uma agulha de pequeno diâmetro (calibre 26G) na crura esquerda do pênis (figura 6A). Essa agulha foi conectada a um transdutor adicional por meio de um tubo heparinizado de polipropileno de calibre menor (PE10). A incisão original da laparotomia foi estendida até a base do pênis. O NC foi novamente localizado e, após manipulação cuidadosa, um eletrodo bipolar de platina com ganchos paralelos (2 mm de distância) foi colocado ao redor do nervo, distalmente ao gânglio, mas proximal à área de lesão do nervo (figura 6B). O eletrodo foi conectado a um estimulador elétrico (Grass S48, Quincy, Massachusetts, EUA), demonstrado na figura 7. Em conformidade com estudos anteriores e recomendações de grupos de pesquisa com vasta experiência com o modelo experimental (MULHALL et al., 2008; HANEY et al., 2017; WEYNE et al., 2020), foram utilizados os seguintes parâmetros de estimulação: intensidade de corrente de 1,5mA, largura de pulso de 5 milissegundos, atraso (*delay*) de 35 milissegundos, tensão elétrica de 8 volts e três frequências diferentes (4, 8 e 16 Hz). A duração da estimulação foi de 1 minuto, com um período de descanso de 3 a 5 minutos entre os estímulos. Para cada uma das três diferentes frequências, a PIC máxima gerada com a correspondente PAM (relação PIC/PAM) foi registrada e apresentada em porcentagem para normalizar as variações da pressão arterial sistêmica. Para avaliar a FE, também foi calculada a área normalizada total sob a curva (AUC) da PIC.

A AUC da PIC (AUC_{PIC}), outro parâmetro bastante utilizado na literatura, tem como objetivo avaliar o tempo de resposta ao estímulo elétrico e não somente as alterações de pressão. O cálculo da área é feito a partir do início da estimulação elétrica até o retorno da resposta aos valores basais de pressão intracavernosa. Uma vez que considera o fator tempo, a AUC_{PIC} faz referência à capacidade de manutenção da ereção,

uma outra importante condição para uma performance sexual satisfatória, além do grau de rigidez peniana propriamente dita.

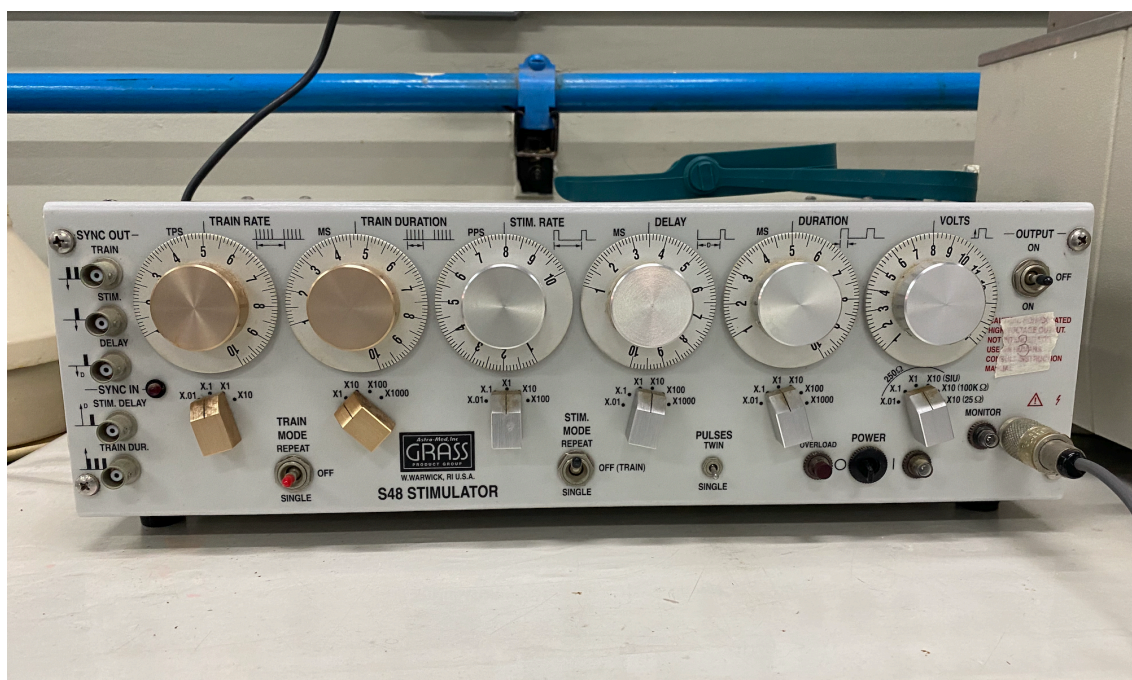
Figura 6 - Punção da crura peniana e posicionamento dos eletrodos para eletroestimulação. Fortaleza, 2023.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: A) Punção da crura peniana esquerda para aferição da PIC. B) Ganchos do eletrodo posicionados no nervo cavernoso para eletroestimulação.

Figura 7 - Estimulador elétrico (Grass S48) utilizado durante os experimentos, com os parâmetros de estimulação ajustados. Fortaleza, 2023.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Histologia e imuno-histoquímica

Após a medição da PIC, os animais foram eutanasiados por injeção intracardíaca letal de cloreto de potássio saturado (KCl), seguida de exsanguinação. Para todos os animais, o pênis, após separado de suas fixações aos ramos isquiopúbicos, foi seccionado. Em uma mesa lateral, o pênis foi dissecado, e todo o tecido extratunical foi removido. O nervo cavernoso e estruturas adjacentes (GPM) também foram removidos e utilizados para análise histológica. Os tecidos penianos e nervos cavernosos foram fixados com formaldeído a 4% em solução salina tamponada com fosfato, embebidos em parafina e cortados em seções de 5µm.

Lâminas de tecido do eixo médio do pênis, mostrando a seção transversal dos corpos cavernosos, foram desparafinizadas, reidratadas e coradas com hematoxilina-eosina. Os corpos cavernosos do pênis dos ratos foram corados imuno-histoquimicamente para o fator neuronal (S100). Em uma segunda análise, para o mesmo corte transversal do pênis, foi selecionado o maior nervo dorsal e igualmente corado com S100.

Cortes dos nervos cavernosos e tecidos adjacentes foram corados com hematoxilina-eosina e imuno-histoquimicamente marcados com Ki-67.

As lâminas utilizadas no estudo foram digitalizadas em 40x usando a plataforma MoticEasyScan. Para análise das imagens, o *software* de código aberto QuPath-0.4.2 foi utilizado. No QuPath, o tipo de imagem de campo claro (H-DAB) foi selecionado com ampliação x40 e pixels de 0,25µm. Ferramenta de anotação de região de interesse foi utilizada para delimitar as regiões que foram pontuadas; tais regiões foram anotadas digitalmente por um patologista experiente. Dentro das regiões de interesse, as células positivas foram detectadas. Os resultados das avaliações foram tabulados para análise estatística.

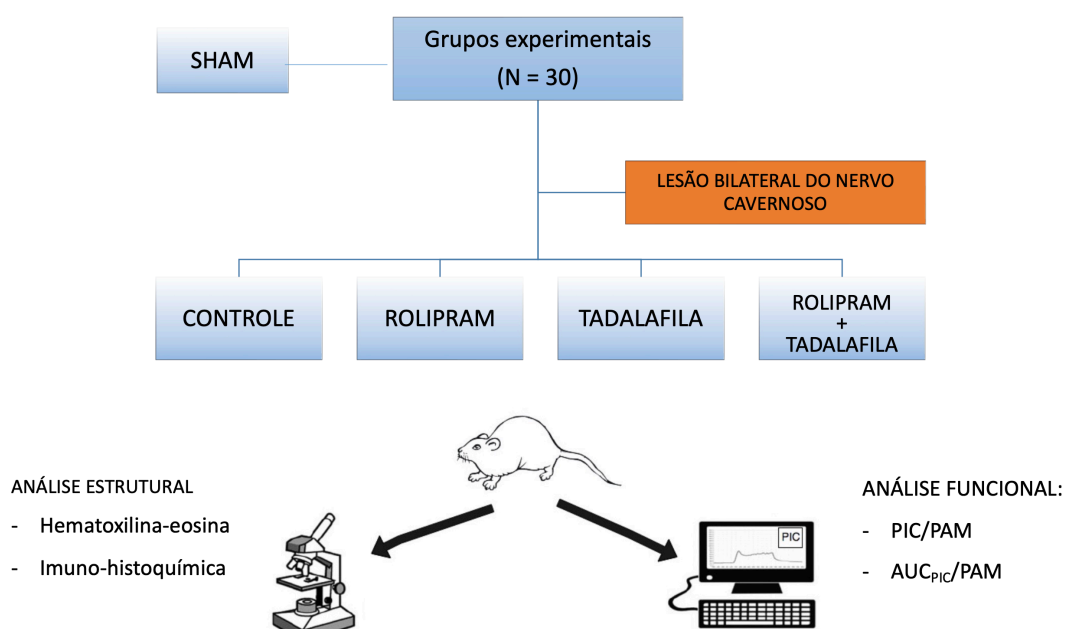
A proteína S100 é utilizada como marcador imuno-histoquímico de tecido neural, mais especificamente de células gliais (XU et al., 2017). No presente estudo, foi utilizado o anticorpo policlonal de coelho, anti-S100, de acordo com as recomendações do fabricante (Dako Agilent, Santa Clara, CA, EUA).

O Ki-67 é uma proteína nuclear, codificada pelo gene MKI67 (antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki-67), e está estritamente relacionado com a proliferação celular. Durante a interfase, o antígeno Ki-67 pode ser detectado exclusivamente no núcleo celular, enquanto que durante a divisão celular (mitose) a maior parte desta proteína é realocada na superfície cromossômica. Está presente durante todas

as fases ativas do ciclo celular, mas ausente em células em repouso. Como o antígeno Ki-67 está presente apenas em células em proliferação (normais e tumorais), trata-se de um excelente marcador para determinar a fração de crescimento de uma determinada população de células (SCHOLZEN; GERDES, 2000). No presente estudo, foi utilizado o anticorpo primário monoclonal de coelho, anti-Ki-67, de acordo com as recomendações do fabricante (Ventana Medical Systems, Arizona, EUA).

A figura 8 demonstra um resumo do protocolo realizado.

Figura 8 - Resumo do protocolo experimental. Fortaleza, 2023.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad, versão 8.00 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Para a avaliação funcional, os dados foram expressos como média \pm SEM (erro padrão da média), e grupos múltiplos foram comparados usando análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. Para a avaliação imuno-histoquímica, os dados foram expressos como média \pm desvio-padrão (DP), e os grupos foram comparados usando análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Dunnett. Foi considerado $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

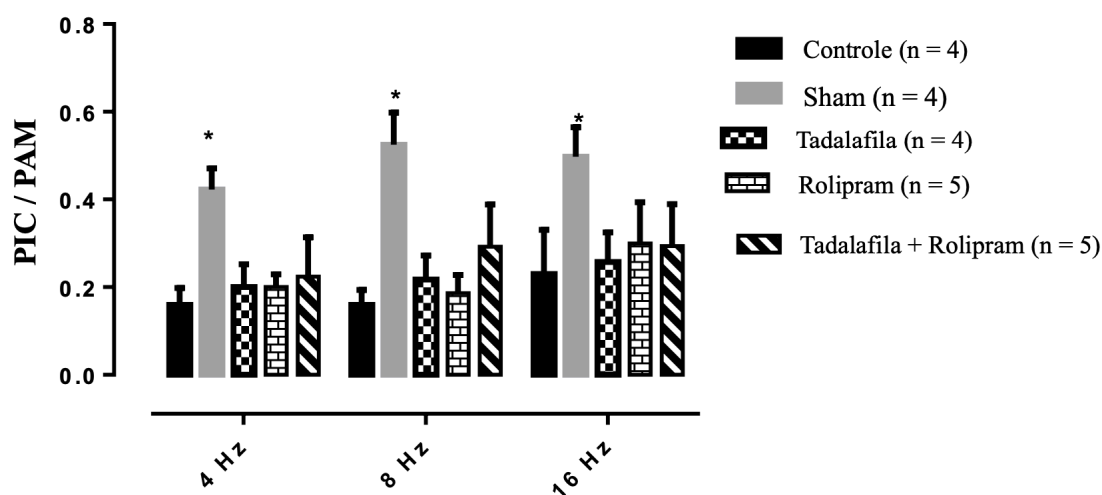
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação funcional (hemodinâmica erétil)

Para avaliação funcional, considerou-se o seguinte número de animais por grupo: sham (n=4); LBNC (n=4); LBNC + tadalafila (n=4); LBNC + rolipram (n=5); LBNC + tadalafila + rolipram (n=5). Duas semanas após a lesão do NC, os ratos LBNC (grupo com lesão do nervo) exibiram resposta erétil diminuída após eletroestimulação em comparação ao grupo sham (sem lesão do nervo) ($p < 0,05$). Isso foi observado ao considerar a máxima pressão intracavernosa (relação PIC/PAM) e ao analisar a área sob a curva da PIC ($AUC_{PIC/PAM}$) nas diferentes frequências avaliadas (gráficos 1 e 2).

Não foram encontradas diferenças significativas na relação PIC/PAM máxima ao comparar os grupos de tratamento (LBNC + tadalafila, LBNC + rolipram, LBNC + tadalafila + rolipram) com o grupo de lesão nervosa (LBNC) (gráfico 1).

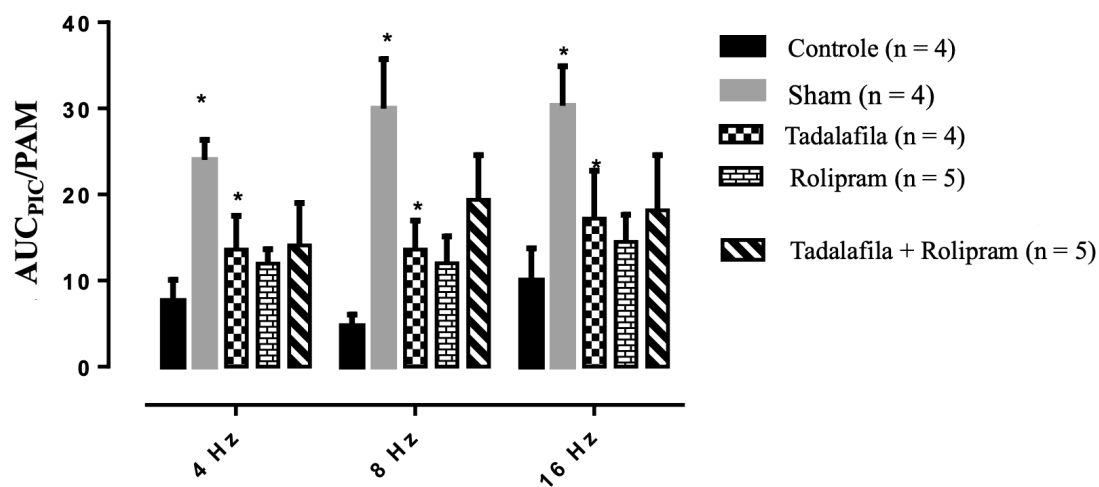
Gráfico 1 - PIC obtida por estimulação do nervo cavernoso (4, 8 e 16Hz). Fortaleza, 2023.



Nota: PIC obtida por estimulação do nervo cavernoso (4-16 Hz) em animais com lesão do NC tratados com tadalafila (5mg/Kg/dia), rolipram (1mg/Kg/dia) ou associação de tadalafila e rolipram (5mg/Kg/dia e 1mg/Kg/dia, respectivamente), durante 14 dias. Os dados representam a média \pm SEM, n = 4 e 5 animais diferentes. Os grupos foram comparados usando análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. * $P < 0,05$: significativamente diferente do grupo LBNC (controle). PIC, pressão intracavernosa; PAM, pressão arterial média; n, número de experimentos.

Ao considerar a área sob a curva de pressão intracavernosa (AUC_{PIC}/PAM), os ratos tratados com tadalafila apresentaram melhora significativa da resposta erétil em relação ao grupo controle (LBNC) nas três frequências analisadas (4Hz, 8Hz e 16Hz). Os animais que receberam rolipram diariamente tenderam a ter uma relação AUC_{PIC}/PAM maior em comparação ao grupo nervo lesado (LBNC), mas a diferença não alcançou significância estatística ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos LBNC + tadalafila + rolipram e controle (grupo com lesão nervosa). Aparentemente, a terapia combinada de tadalafila e rolipram não forneceu um efeito aditivo. Nenhuma outra comparação entre os grupos alcançou diferença estatisticamente significativa (gráfico 2).

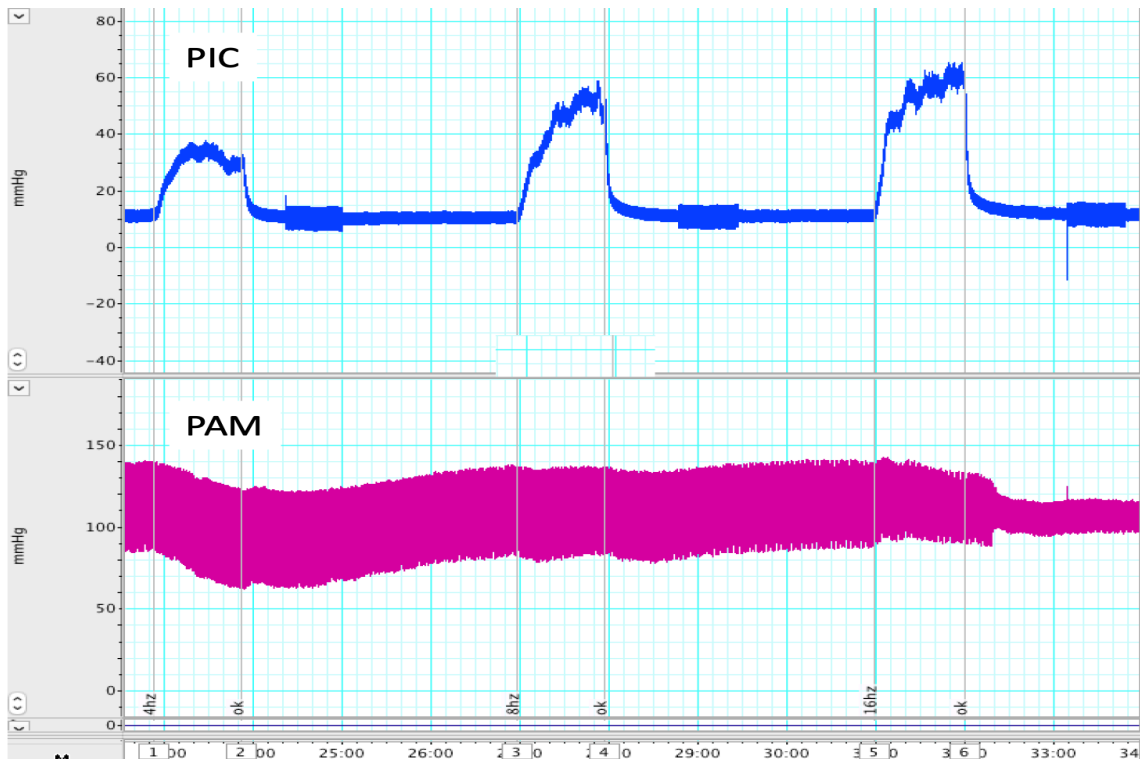
Gráfico 2 - Área sob a curva da PIC obtida por estimulação do nervo cavernoso (4, 8 e 16Hz). Fortaleza, 2023.



Nota: Área sob a curva da PIC (AUC_{PIC}) obtida por estimulação do nervo cavernoso (4-16 Hz) em animais com lesão do NC tratados com tadalafila (5mg/Kg/dia), rolipram (1mg/Kg/dia) ou associação de tadalafila e rolipram (5mg/Kg/dia e 1mg/Kg/dia, respectivamente), durante 14 dias. Os dados representam a média \pm SEM, n = 4 e 5 animais diferentes. Os grupos foram comparados usando análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. * $P < 0,05$: significativamente diferente do grupo LBNC (controle). PIC, pressão intracavernosa; PAM, pressão arterial média; n, número de experimentos.

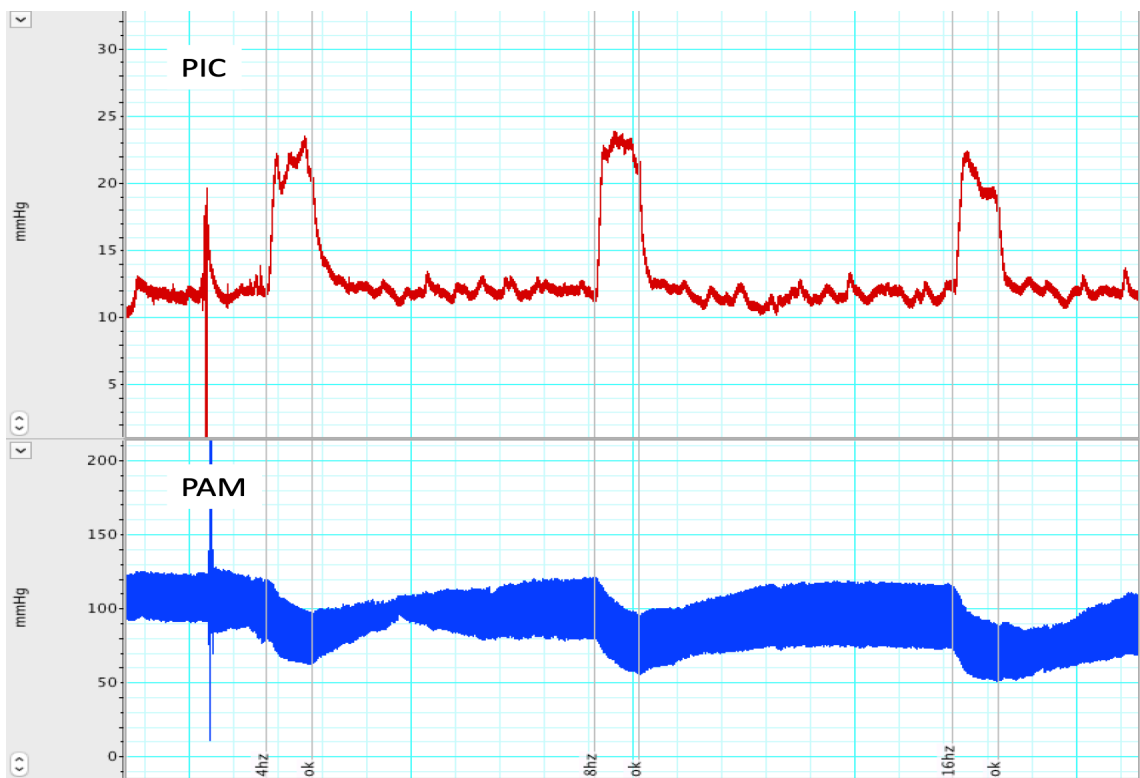
As figuras 9, 10 e 11 são exemplos dos registros de PIC e PAM obtidos durante a eletroestimulação do NC.

Figura 9 - Experimento do grupo sham (i). Fortaleza, 2023.



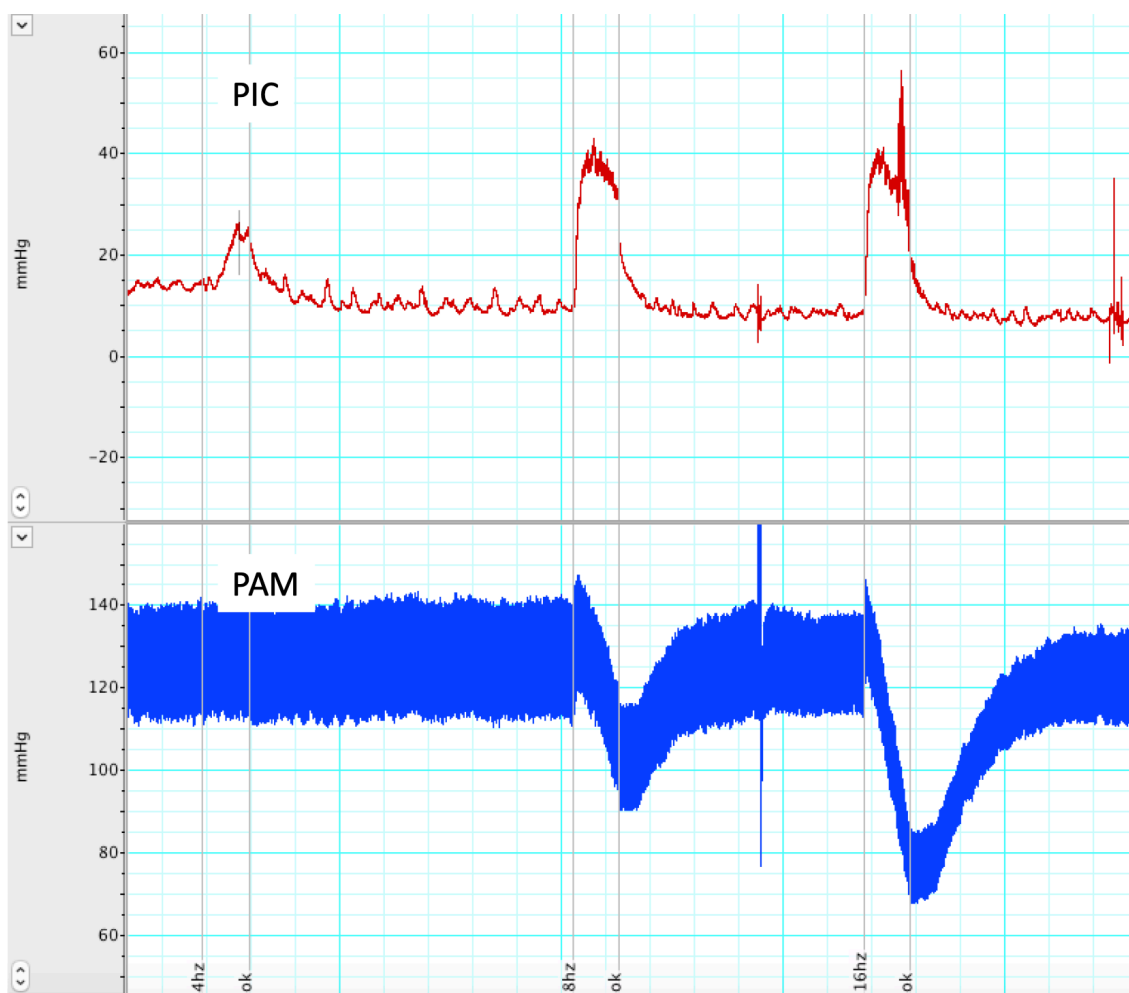
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - Experimento do grupo LBNC + tadalafila (iii). Fortaleza, 2023.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Experimento do grupo LBNC + rolipram (iv). Fortaleza, 2023.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Avaliação estrutural (análise imuno-histoquímica)

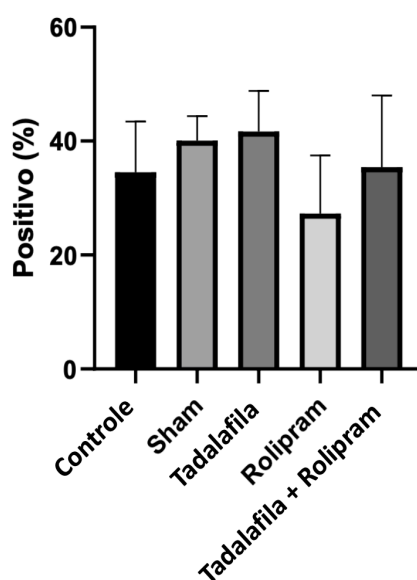
Para a avaliação imuno-histoquímica, considerou-se o seguinte número de animais por grupo: sham (n=5); LBNC (n=5); LBNC + tadalafila (n=5); LBNC + rolipram (n=5); LBNC + tadalafila + rolipram (n=5).

Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma das comparações quando considerada a positividade do marcador imuno-histoquímico S100 no corpo cavernoso (gráfico 3).

Quando analisado o mesmo marcador no nervo dorsal peniano, o grupo sham apresentou uma área percentual de marcação de $84,82 \pm 5,53\%$, enquanto o grupo controle (LBNC) apresentou área percentual de marcação de $63,24 \pm 16,68\%$, ou seja,

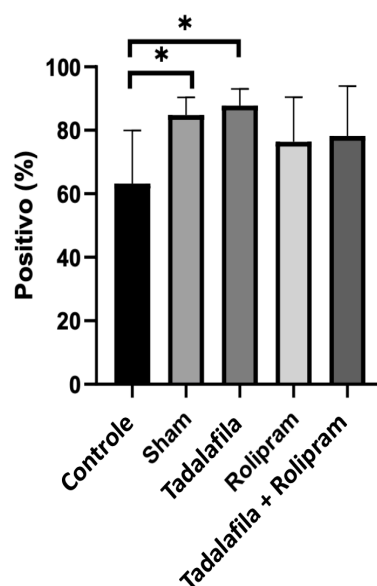
houve uma diminuição significativa da expressão de S100 nessa topografia ($p = 0,04$). Constatou-se também um aumento da área percentual de positividade de marcação no grupo de animais tratados com tadalafila ($87,82 \pm 5,23\%$) quando comparado com o grupo controle ($63,24 \pm 16,68\%$), ou seja, a tadalafila promoveu um aumento de expressão de S100 no nervo dorsal peniano ($p = 0,01$) (gráfico 4). Por outro lado, o mesmo não ocorreu quando comparamos os animais do grupo rolipram ou da associação (tadalafila + rolipram) com o grupo controle nessa mesma topografia ($p > 0,05$).

Gráfico 3 - Área percentual (%) de expressão de S100 no corpo cavernoso do pênis. Fortaleza, 2023.



Fonte: Elaborado pelo autor.

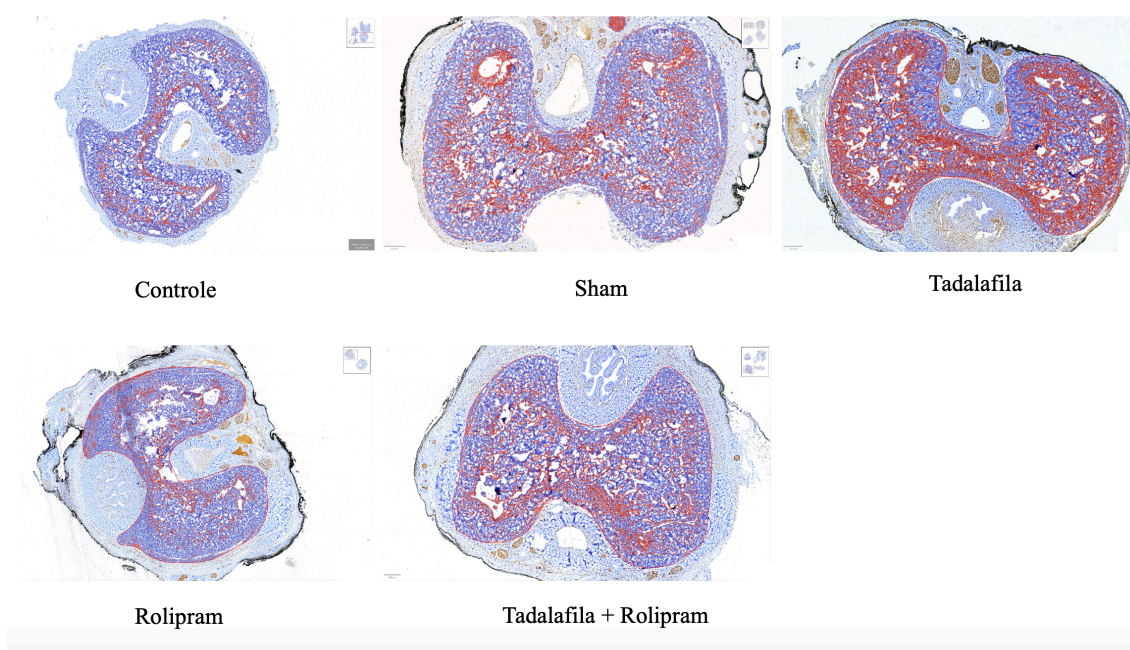
Gráfico 4 - Área percentual (%) de expressão de S100 no nervo dorsal do pênis. Fortaleza, 2023.



Nota: Os grupos foram comparados usando análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Dunnett. * $p < 0,05$; significativamente diferente do grupo controle (LBNC).

As figuras 12 e 13 são exemplos da marcação por S100 no corpo cavernoso e no nervo dorsal do pênis respectivamente.

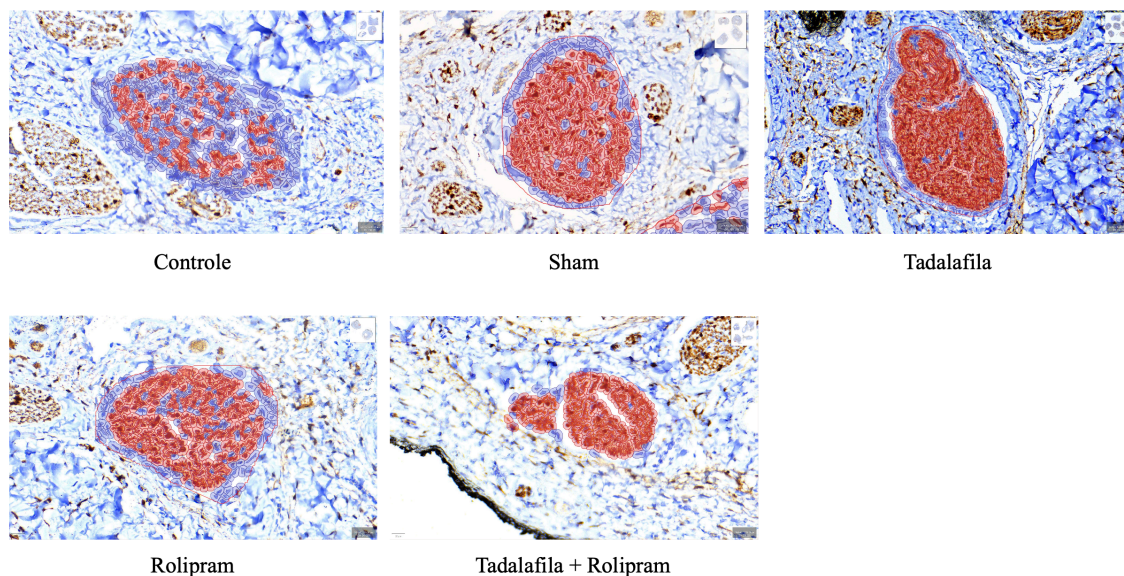
Figura 12 - Marcação de S100 em um exemplo de secção transversal de corpo cavernoso para cada grupo de animais. Fortaleza, 2023.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: A positividade do S100 foi destacada através do *software* QuPath. Não houve diferença do percentual de positividade do marcador imuno-histoquímico dentro do corpo cavernoso entre os diferentes grupos.

Figura 13 - Marcação de S100 em um exemplo de secção transversal do nervo dorsal do pênis para cada grupo de animais. Fortaleza, 2023.

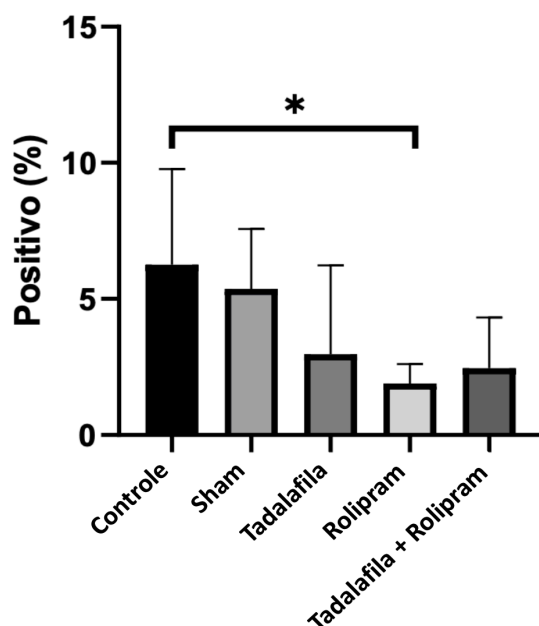


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: A positividade do S100 foi destacada através do *software* QuPath. O grupo tratado com tadalafila apresentou maior expressão de S100 no nervo dorsal peniano quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$).

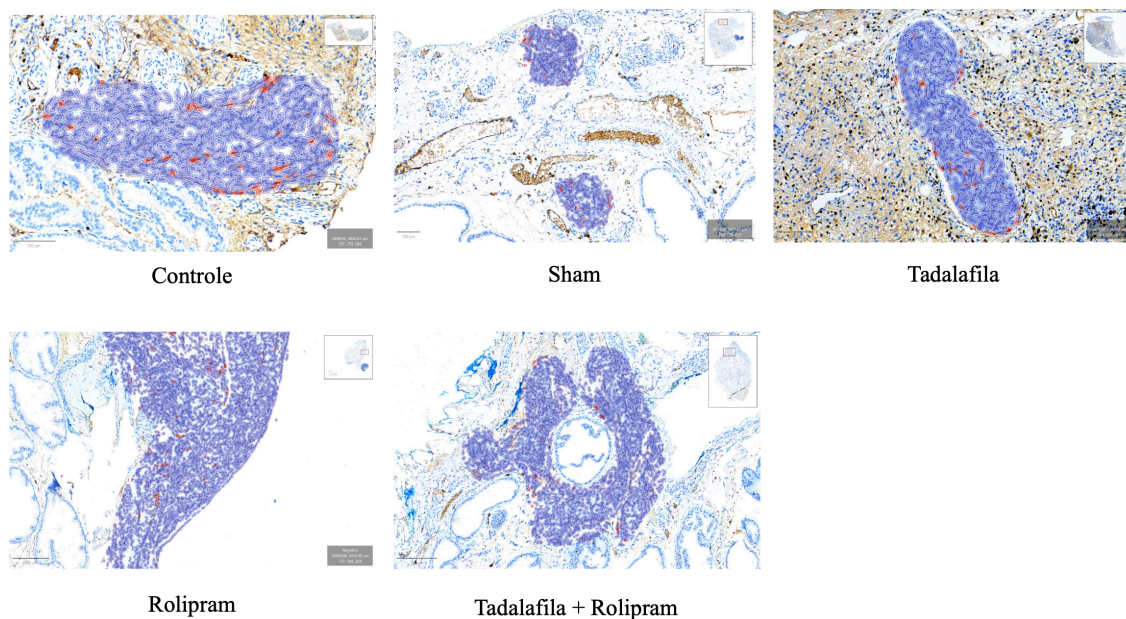
Para o marcador imuno-histoquímico Ki-67, foi encontrada uma área percentual de expressão significativamente menor no nervo cavernoso do grupo tratado com rolipram ($1,89 \pm 0,71\%$), quando comparado com o grupo controle ($6,26 \pm 3,50\%$; $p = 0,03$). As demais comparações entre os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (gráfico 5). A figura 14 apresenta exemplos de marcação de Ki-67 no nervo cavernoso.

Gráfico 5 - Área percentual (%) de expressão de Ki-67 no nervo cavernoso. Fortaleza, 2023.



Nota: Os grupos foram comparados usando análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Dunnett. * $p < 0,05$; significativamente diferente do grupo controle (LBNC).

Figura 14 - Exemplo de marcação com Ki-67 em lâmina de nervo cavernoso nos diferentes grupos. Fortaleza, 2023.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: A positividade do Ki-67 foi destacada através do software QuPath. O grupo tratado com rolipram apresentou menor expressão de Ki-67 no nervo cavernoso quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Novas descobertas acerca da fisiopatologia da disfunção erétil pós-PR levaram à investigação e desenvolvimento de diferentes estratégias de reabilitação peniana. Essas novas terapias são promissoras, mas ainda são controversas devido à falta de evidências fortes (MULHALL et al., 2007). Devido à sua alta incidência e aos altos índices de falha terapêutica, a busca por estratégias alternativas para o tratamento de DE pós-PR é definitivamente justificada (MARTÍNEZ-SALAMANCA et al., 2016).

Há evidências de que a lesão do NC induz fatores pró-apoptóticos (isto é, perda de músculo liso) e fatores pró-fibróticos (isto é, aumento de colágeno) nos corpos cavernosos (RAMBHATLA et al., 2008). Com base nessa teoria, a fibrose e a atrofia do músculo liso observadas no tecido cavernoso podem ser devidas à supressão de certos fatores-chave de crescimento produzidos pelo NC e à produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio pelos axônios nervosos danificados (KOVANECZ et al., 2008; FERRINI et al., 2006). O tecido cavernoso neutraliza esse processo por meio da indução endógena da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) e seu segundo mensageiro, GMPc. Esta teoria serve para justificar a administração de IPDE5 após PR (HATZIMOURATIDIS et al., 2009). O presente estudo mostrou em sua análise funcional uma redução significativa na resposta erétil após LBNC quando comparado ao grupo de animais não operados, corroborando o importante impacto negativo deste tipo de lesão, já bem demonstrado na literatura (MULHALL et al., 2008; SALMASI et al., 2016; (MARTÍNEZ-SALAMANCA et al., 2016).

Os IPDE5 aumentam os níveis de GMPc, que, por sua vez, exercem uma ação antifibrótica no tecido cavernoso. A produção de GMPc é dependente de NO. Como a produção de NO pela sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS) é prejudicada após a cirurgia, o NO é produzido principalmente a partir da indução de iNOS e eNOS. O uso a longo prazo de um IPDE5 pode amplificar a via de sinalização de NO deprimida, minimizando a fibrose associada à hipóxia (HATZIMOURATIDIS et al., 2009). Vários estudos experimentais anteriores avaliaram os benefícios de diferentes IPDE5 na restauração da função erétil após lesão do nervo cavernoso, por meio de parâmetros funcionais e histológicos (HATZIMOURATIDIS et al., 2009). Demonstrou-se que a sildenafil (1) melhora ou normaliza a proporção de músculo liso/colágeno, (2) aumenta a replicação do músculo liso, (3) reduz o índice apoptótico e (4) mantém a integridade endotelial (preservando a expressão de CD31 e eNOS) (FERRINI et al., 2007;

KOVANECZ et al., 2008a; LAGODA et al., 2007; MULHALL et al., 2008). Por sua vez, a tadalafila foi capaz de normalizar a proporção de músculo liso/colágeno, aumentar a replicação do músculo liso e reduzir o índice apoptótico; mas não resgatou a subexpressão de nNOS e eNOS induzida pela neurectomia (KOVANECZ et al., 2008b; LYSIAK et al., 2008; VIGNOZZI et al., 2006). Finalmente, a vardenafila demonstrou ser capaz de aumentar a expressão de iNOS e a replicação de células musculares lisas, com normalização da relação entre músculo liso e colágeno, sem afetar o índice de apoptose (FERRINI et al., 2006). Como esperado, no presente estudo houve melhora da função erétil com tadalafila, identificada por meio da análise da área sob a curva da PIC.

Salmasi et al. (2016) sugeriram que a propriedade neuroprotetora da sildenafil poderia ser atribuída ao efeito em outras fosfodiesterases, como a tipo 4, devido à expressão seletiva dessa isoforma e à falta de expressão de fosfodiesterase do tipo 5 em linhas celulares neuronais. Esses achados foram ainda corroborados pela descoberta de níveis aumentados de AMPc, que tem uma associação conhecida com a PDE4 (HOUSLAY et al., 2003), no grupo tratado com sildenafil, quando comparado a grupos tratados com outros IPDE. *Knockdown* do gene da fosfodiesterase do tipo 4 e o tratamento com rolipram, um inibidor seletivo da PDE4, resultaram em padrões semelhantes de morte celular, sugerindo que o bloqueio da PDE4 pode ser responsável pela prevenção mediada pela sildenafil da morte celular neuronal por hipóxia e espécies reativas de oxigênio (SALMASI et al., 2016).

Uma estratégia dupla envolvendo inibição de PDE5 e PDE4 poderia alcançar maior eficácia na recuperação de FE após lesão do NC do que abordagens individuais. Embora estudos anteriores tenham sugerido que a PDE4 pode representar um importante alvo terapêutico para homens com DE pós-PR (SALMASI et al., 2016), nossos resultados funcionais não mostraram benefício com o tratamento com rolipram ou com a combinação de rolipram e tadalafila. O número reduzido de animais no presente estudo pode ter contribuído para a falta de melhora funcional com o tratamento com IPDE4 ou sua associação com IPDE5, pois foi observado uma tendência de melhora nesses dois grupos na análise da área sob a curva da PIC. Talvez estudos semelhantes com um número maior de animais possam alcançar uma diferença estatística com o rolipram ou com o tratamento combinado.

Em se tratando da avaliação estrutural, a proteína S100 pode ser utilizada como um marcador indireto de neuro-proteção e neuroregeneração, pois está presente nas células gliais. As células de Schwann, células gliais que envolvem o sistema nervoso

periférico, são cruciais para a função normal e reparo do nervo (JESSEN et al., 2015). Assim como em estudos anteriores (SALMASI et al., 2016; XU et al., 2017), foi avaliada a expressão do marcador imuno-histoquímico de tecido neural em duas topografias: corpo cavernoso e nervo dorsal do pênis. Embora o nervo dorsal do pênis não se origine do nervo cavernoso, mas sim do nervo pudendo, Xu et al. (2017) sugeriram que, no modelo experimental, esse nervo, por razões ainda desconhecidas, parece refletir as alterações neurais que ocorrem dentro do corpo cavernoso, servindo para uma análise indireta. Salmasi et al. (2016) demonstraram uma expressão aumentada de um outro marcador imuno-histoquímico neural (neurofilamento) no nervo dorsal do pênis de ratos que receberam tanto sildenafil como rolipram em nano-esferas posicionadas no local da injúria nervosa. No presente estudo, em que os animais foram tratados por via oral, houve uma diminuição da expressão de S100 no nervo peniano dorsal do grupo controle em relação ao grupo sham, demonstrando o impacto da injúria do nervo cavernoso nos tecidos neuronais distais. Foi observado também uma maior expressão de S100 no nervo dorsal peniano do grupo tratado com tadalafila em relação ao grupo controle, ou seja, a tadalafila pode ter contribuído para algum grau de preservação nervosa.

No presente estudo, os animais tratados com rolipram apresentaram uma significativa menor expressão de Ki-67 em relação ao grupo controle. Sabe-se que esse marcador apresenta uma acurácia maior em tecidos neoplásicos, onde a grau de proliferação celular é bem mais pronunciado; entretanto, uma menor marcação de Ki-67 no nervo cavernoso após uma injúria mecânica talvez possa sugerir que o rolipram foi capaz de promover uma maior proteção àquela população de células e subsequente menor proliferação celular.

A LBNC no rato é o modelo animal mais aceito para estudar DE pós-PR. No entanto, sua capacidade translacional e aplicabilidade clínica em humanos ainda é discutível (HANEY et al., 2017). Uma das limitações desse modelo experimental é a grande variabilidade da metodologia empregada ao longo de décadas de sua utilização, o que dificulta e até mesmo impossibilita a comparação dos resultados dos diferentes estudos. Para minimizar esse problema, é importante que os protocolos de pesquisa procurem seguir diretrizes já publicadas para padronizar as inúmeras variáveis do modelo: tipo e local da injúria nervosa, parâmetros e local de estimulação elétrica etc (HANEY et al., 2017; WEYNE et al., 2020). O presente estudo procurou seguir as principais recomendações já testadas e estabelecidas anteriormente, por exemplo: lesão nervosa bilateral e não unilateral; normalização da PIC e análise da relação PIC/PAM, já

que a PIC pode ser afetada pela hemodinâmica do animal; tipo de injúria utilizada em todos os experimentos (esmagamento ao invés de transecção ou ressecção do nervo); posição dos eletrodos e subsequente estímulo elétrico proximal à lesão nervosa, ou seja, entre o GPM e a área de esmagamento, uma vez que se pretende estudar a regeneração nervosa; idade dos animais de aproximadamente 12 semanas e peso entre 300g e 400g (WEYNE et al., 2020). Essa padronização pode ajudar a diminuir a lacuna existente entre os estudos pré-clínicos e sua aplicação na prática clínica. Além disso, é essencial ter em mente que a DE pós-PR é um processo multifatorial, que não pode ser suficientemente explicado apenas pelo modelo neurogênico.

Além daquelas inerentes ao próprio modelo animal, este estudo apresenta outra limitação relevante: apenas uma dose de tadalafila e de rolipram foram testadas no estudo *in vivo*. Estudos adicionais são necessários para investigar diferentes doses dos IPDE. A dose de tadalafila utilizada (5mg/kg/dia) foi a mesma utilizada por Martínez-Salamanca et al. (2016). De acordo com o método de área de superfície corporal para extrapolação de doses de animal para humano, essa dose de tadalafila seria equivalente a aproximadamente 0,8mg/kg em humanos (REAGAN-SHAW et al., 2008), a qual, embora não seja extremamente alta, é maior do que a usada para tratar DE em homens. De fato, a maioria dos estudos em animais mostrando efeitos regenerativos ou protetores desse IPDE5 usou doses semelhantes ou maiores do que as administradas na presente investigação (MARTÍNEZ-SALAMANCA et al., 2016; ZHANG et al., 2006). De acordo com Schaal et al. (2012), a dose de rolipram utilizada no presente estudo (1mg/kg/dia) apresenta efeito neuroprotetor independente da via de administração (oral, subcutânea ou intravenosa).

Apesar das limitações citadas, a presente investigação, em concordância com estudos anteriores, permitiu confirmar efeito positivo na recuperação da função erétil da tadalafila nesse modelo experimental, demonstrado de forma direta na análise funcional (AUC da PIC) e de forma indireta na análise estrutural (maior expressão de S100 no nervo dorsal peniano). Apesar de não ter sido capaz de comprovar benefício do tratamento com rolipram ou terapia combinada, o presente estudo sugere que pesquisas adicionais são necessárias para investigar o real papel dos IPDE4 nesse cenário.

Um ponto relevante é que na presente investigação foi realizada de forma pioneira uma avaliação estrutural do nervo cavernoso. Os demais estudos até então limitaram-se a avaliar os efeitos das diferentes terapias na neuro-proteção e neuroregeneração do NC de forma indireta, através do nervo dorsal peniano ou através

da expressão de marcadores imuno-histoquímicos de tecido neural no corpo cavernoso. Esse diferente sítio de investigação pode ser um importante alvo de novas pesquisas, com possibilidade de contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia da DE pós-PR e conseqüente proposição de estratégias terapêuticas mais eficazes.

7 CONCLUSÃO

O tratamento da DE após PR tem um impacto positivo considerável na qualidade de vida do paciente e do casal. Os IPDE4 ainda não foram extensivamente investigados em medicina sexual. No modelo experimental de lesão bilateral do nervo cavernoso em ratos, o rolipram não foi capaz de promover melhora da resposta erétil e também não demonstrou ter efeito sinérgico quando associado à tadalafila. Estudos adicionais são necessários para definir a real relevância dos IPDE4 na recuperação da função erétil após lesão nervosa.

REFERÊNCIAS

ALBERSEN, M.; SHINDEL, A.W.; MWAMUKONDA, K.B.; LUE, T.F. The future is today: emerging drugs for the treatment of erectile dysfunction. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 15, n. 3, p. 467-80, 2010.

ANDERSSON, K.E.; DE GROAT, W.C.; MCVARY, K.T.; LUE, T.F.; MAGGI, M.; ROEHRBORN, C.G. et al. Tadalafil for the treatment of lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia: pathophysiology and mechanism(s) of action. **Neurourol Urodyn.**, v. 30, n. 3, p. 292-301, 2011.

ANDERSSON, K.E.; UCKERT, S.; STIEF, C.; HEDLUND, P. Phosphodiesterases (PDEs) and PDE inhibitors for treatment of LUTS. **Neurourol Urodyn.**, v. 26, n. 6, p. 928-33, 2007.

AOUN, F.; PELTIER, A.; VAN VELTHOVEN, R. Penile rehabilitation after pelvic cancer surgery. **Scient. World J.**, [S.L.], v. 2015, p. e876046, 2015.

BANYA, Yoshiaki; USHIKI, Tatsuo; TAKAGANE, Hiroshi; AOKI, Hikaru; KUBO, Takashi; OHHORI, Tsutomu; IDE, Chizuka. Two Circulatory Routes Within the Human Corpus Cavernosum Penis: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. **J Urol**, [S.L.], v. 142, n. 3, p. 879-883, set. 1989.

BOORJIAN, S.A.; EASTHAM, J.A.; GRAEFEN, M.; GUILLONNEAU, B.; KARNES, R.J.; MOUL, J.W. et al. A critical analysis of the long-term impact of radical prostatectomy on cancer control and function outcomes. **Eur Urol.**, v. 61, n. 4, p. 664-75, 2012.

BORREGALES, Leonardo D.; BERG, William T.; TAL, Oded; WAMBI, Chris; KAUFMAN, Sarah; GAYA, Jose M.; URZŏA, Cristian; BADANI, Ketan K.. 'Trifecta' after radical prostatectomy: is there a standard definition?. **BJU Int.**, [S.L.], v. 112, n. 1, p. 60-67, 11 jun. 2013.

BRIGANTI, A.; GALLINA, A.; SUARDI, N.; CAPITANIO, U.; TUTOLO, M.; BIANCHI, M. et al. Predicting erectile function recovery after bilateral nerve sparing radical prostatectomy: a proposal of a novel preoperative risk stratification. **J Sex Med.**, v. 7, n. 7, p. 2521-31, 2010.

BRIGANTI, A.; DI TRAPANI, E.; ABDOLLAH, F.; GALLINA, A.; SUARDI, N.; CAPITANIO, U. et al. Choosing the best candidates for penile rehabilitation after bilateral nerve-sparing radical prostatectomy. **J Sex Med.**, v. 9, n. 2, p. 608-17, 2012.

BURNETT, A.L. General use of animal models for investigation of the physiology of erection. **Int J Impot Res.**, v. 13, n. 3, p. 135-9, 2001.

CATALONA, W.J.; CARVALHAL, G.F.; MAGER, D.E.; SMITH, D.S. Potency, continence and complication rates in 1,870 consecutive radical retropubic prostatectomies. **J Urol.**, v. 162, n. 2, p. 433-8, 1999.

CELLEK, S.; BIVALACQUA, T.J.; BURNETT, A.L.; CHITALEY, K.; LIN, C.S. Common pitfalls in some of the experimental studies in erectile function and dysfunction: a consensus article. **J Sex Med.**, v. 9, n. 11, p. 2770-84, 2012.

CHEN, X.M.; WANG, N.N.; ZHANG, T.Y.; WANG, F.; WU, C.F.; YANG, J.Y. Neuroprotection by sildenafil: neuronal networks potentiation in acute experimental stroke. **CNS Neurosci Ther.**, v. 20, n. 1, p. 40-9, 2014.

CHUNG, E.; DE YOUNG, L.; BROCK, G.B. Investigative models in erectile dysfunction: a state-of-the-art review of current animal models. **J Sex Med.**, v. 8, n. 12, p. 3291-305, 2011.

COSTA, L.M.; PEREIRA, J.E.; FILIPE, V.M.; MAGALHÃES, L.G.; COUTO, P.A.; GONZALO-ORDEN, J.M. et al. Rolipram promotes functional recovery after contusive thoracic spinal cord injury in rats. **Behav Brain Res.**, v. 243, p. 66-73, 2013.

DELONGCHAMPS, N.B.; SINGH, A.; HAAS, G.P. The role of prevalence in the diagnosis of prostate cancer. **Cancer Control.**, v. 13, n. 3, p. 158-68, 2006.

DUBBELMAN, Yvette D.; DOHLE, Gert R.; SCHRÖDER, Frits H.. Sexual Function Before and After Radical Retropubic Prostatectomy: a systematic review of prognostic indicators for a successful outcome. **Eur Urol**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 711-720, out. 2006.

FERRINI, M.G.; DAVILA, H.H.; KOVANEZ, I.; SANCHEZ, S.P.; GONZALEZ-CADAVID, N.F.; RAJFER, J. Vardenafil prevents fibrosis and loss of corporal smooth muscle that occurs after bilateral cavernosal nerve resection in the rat. **Urology**, v. 68, n. 2, p. 429-35, 2006.

FERRINI, M.G.; KOVANEZ, I.; SANCHEZ, S.; VERNET, D.; DAVILA, H.H.; RAJFER, J. et al. Long-term continuous treatment with sildenafil ameliorates aging-related erectile dysfunction and the underlying corporal fibrosis in the rat. **Biol Reprod.**, v. 76, n. 5, p. 915-23, 2007.

FICARRA, V.; NOVARA, G.; AHLERING, T.E.; COSTELLO, A.; EASTHAM, J.A.; GRAEFEN, M.; GUAZZONI, G.; MENON, M.; MOTTRIE, A.; PATEL, V.R. Systematic Review and Meta-analysis of Studies Reporting Potency Rates After Robot-assisted Radical Prostatectomy. **Eur Urol**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 418-430, set. 2012.

FOURNIER, G.R.; JUENEMANN, K.P.; LUE, T.F.; TANAGHO, E.A. Mechanisms of Venous Occlusion During Canine Penile Erection: an anatomic demonstration. **J Urol**, [S.L.], v. 137, n. 1, p. 163-167, jan. 1987.

GOLDSTEIN, I.; GOREN, A.; LI, V.W.; TANG, W.Y.; HASSAN, T.A. Epidemiology Update of Erectile Dysfunction in Eight Countries with High Burden. **Sex Med Rev.**, v. 8, n. 1, p. 48-58, 2020.

GONZALEZ-CADAVID, N.F. Mechanisms of penile fibrosis. **J Sex Med.**, v. 6, n. 3, p. 353-62, 2009.

HAKKY, T.S.; BAUMGARTEN, A.S.; PARKER, J.; ZHENG, Y.; KONGNYUY, M.; MARTINEZ, D. et al. Penile rehabilitation: the evolutionary concept in the management of erectile dysfunction. **Curr Urol Rep.**, v. 15, n. 4, p. 393, 2014.

HLAING, S.M.; GARCIA, L.A.; KOVANEZ, I.; MARTINEZ, R.A.; SHAH, S.; ARTAZA, J.N. et al. Sildenafil promotes neuroprotection of the pelvic ganglia neurones after bilateral cavernosal nerve resection in the rat. **BJU Int.**, v. 111, n. 1, p. 159-70, 2013.

HANEY, N.M.; NGUYEN, H.M.T.; HONDA, M.; ABDEL-MAGEED, A.B.; HELLSTROM, W.J.G. Bilateral Cavernous Nerve Crush Injury in the Rat Model: A Comparative Review of Pharmacologic Interventions. **Sex Med Rev.**, v. 6, n. 2, p. 234-41, 2017.

HATZIMOURATIDIS, K.; BURNETT, A.L.; HATZICHRISTOU, D.; MCCULLOUGH, A.R.; MONTORSI, F.; MULHALL, J.P. Phosphodiesterase type 5 inhibitors in postprostatectomy erectile dysfunction: a critical analysis of the basic science rationale and clinical application. **Eur Urol.**, v. 55, n. 2, p. 334-47, 2009.

HOUSLAY, M.D.; ADAMS, D.R. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. **Biochem J.**, v. 370, n. 1, p. 1-18, 2003.

IACONO, F.; GIANNELLA, R.; SOMMA, P.; MANNO, G.; FUSCO, F.; MIRONE, V. Histological alterations in cavernous tissue after radical prostatectomy. **J Urol.**, v. 173, n. 5, p. 1673-6, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Estatísticas de câncer. In: INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Câncer. [Brasília, DF]: Instituto Nacional do Câncer, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>. Acesso em: 27 mar. 2023.

IONA, S.; CUOMO, M.; BUSHNIK, T.; NARO, F.; SETTE, C.; HESS, M. et al. Characterization of the rolipram-sensitive, cyclic AMP-specific phosphodiesterases: identification and differential expression of immunologically distinct forms in the rat brain. **Mol Pharmacol.**, v. 53, n. 1, p. 23-32, 1998.

JESSEN, K.R.; MIRSKY, R.; LLOYD, A.C. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 7, n. 7, p. a020487, 2015.

KIM, S.C.; SONG, C.; KIM, W.; KANG, T.; PARK, J.; JEONG, I.G.; LEE, S.; CHO, Y.M.; AHN, H. Factors Determining Functional Outcomes After Radical Prostatectomy: robot-assisted versus retropubic. **Eur Urol**, [S.L.], v. 60, n. 3, p. 413-419, set. 2011.

KIM, J.H.; LEE, S.W. Current status of penile rehabilitation after radical prostatectomy. **Korean J Urol.**, v. 56, n. 2, p. 99-108, 2015.

KLEIN, L.T.; MILLER, M.I.; BUTTYAN, R.; RAFFO, A.J.; BURCHARD, M.; DEVRIS, G. et al. Apoptosis in the rat penis after penile denervation. **J Urol.**, v. 158, n. 2, p. 626-30, 1997.

KOVANECZ, I.; RAMBHATLA, A.; FERRINI, M.; VERNET, D.; SANCHEZ, S.; RAJFER, J. et al. Long-term continuous sildenafil treatment ameliorates corporal veno-occlusive dysfunction (CVOD) induced by cavernosal nerve resection in rats. **Int J Impot Res.**, v. 20, n. 2, p. 202-12, 2008.

KOVANECZ, I.; RAMBHATLA, A.; FERRINI, M.G.; VERNET, D.; SANCHEZ, S.; RAJFER, J. et al. Chronic daily tadalafil prevents the corporal fibrosis and veno-occlusive dysfunction that occurs after cavernosal nerve resection. **BJU Int.**, v. 101, n. 2, p. 203-10, 2008.

KUNDU, S.D.; ROEHL, K.A.; EGGNER, S.E.; ANTENOR, J.O.A.V.; HAN, M.; CATALONA, W.J. Potency, continence and complications in 3,477 consecutive radical retropubic prostatectomies. **J Urol**, [S.L.], v. 172, n. 61, p. 2227-2231, dez. 2004.

LYSIAK, J.J.; YANG, S.K.; KLAUSNER, A.P.; SON, H.; TUTTLE, J.B.; STEERS, W.D. Tadalafil increases Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation, and prevents apoptotic cell death in the penis following denervation. **J Urol.**, v. 179, n. 2, p. 779-85, 2008.

LAGODA, G.; JIN, L.; LEHRFELD, T.J.; LIU, T.; BURNETT, A.L. FK506 and sildenafil promote erectile function recovery after cavernous nerve injury through antioxidative mechanisms. **J Sex Med.**, v. 4, n. 1, p. 908-16, 2007.

LAU, B.Y.; FOGERSON, S.M.; WALSH, R.B.; MORGAN, J.R. Cyclic AMP promotes axon regeneration, lesion repair and neuronal survival in lampreys after spinal cord injury. **Exp Neurol.**, [S.L.], n. 250, p. 31-42, 2013.

LEUNGWATTANAKIJ, S.; BIVALACQUA, T.J.; USTA, M.F.; YANG, D.Y.; HYUN, J.S.; CHAMPION, H.C. et al. Cavernous neurotomy causes hypoxia and fibrosis in rat corpus cavernosum. **J Androl.**, v. 24, n. 2, p. 239-45, 2003.

LIMA, T.F.N.; BITRAN, J.; FRECH, F.S.; RAMASAMY, R. Prevalence of post-prostatectomy erectile dysfunction and a review of the recommended therapeutic modalities. **Int J Impot Res**, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 401-409, 17 nov. 2020.

LINHARES, B.L.; NASCIMENTO, N.R.F.; GONZAGA-SILVA, L.F.; SANTOS, C.F.; MORAES, M.O.; MARINHO, L.B. et al. Effect of co-administration of two different phosphodiesterase inhibitors and a $\beta(3)$ -adrenoceptor agonist in an experimental model of detrusor overactivity. **Eur J Pharmacol.**, v. 833, [S.L.], p. 425-431, 2018.

LUE, T.F. Erectile Dysfunction. **N Engl J Med**, [S.L.], v. 342, n. 24, p. 1802-1813, 15 jun. 2000.

MARTÍNEZ-SALAMANCA, J.I.; ZURITA, M.; COSTA, C.; MARTÍNEZ-SALAMANCA, E.; FERNÁNDEZ, A.; CASTELA, A. et al. Dual Strategy With Oral Phosphodiesterase Type 5 Inhibition and Intracavernosal Implantation of Mesenchymal

Stem Cells Is Superior to Individual Approaches in the Recovery of Erectile and Cavernosal Functions After Cavernous Nerve Injury in Rats. **J Sex Med.**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2016.

MELMAN, A.; GINGELL, J.C. The epidemiology and pathophysiology of erectile dysfunction. **J Urol.**, v. 161, n. 1, p. 5-11, 1999.

MIRANDA, E.P.; BENFANTE, N.; KUNZEL, B.; NELSON, C.J.; MULHALL, J.P. A Randomized, Controlled, 3-Arm Trial of Pharmacological Penile Rehabilitation in the Preservation of Erectile Function After Radical Prostatectomy. **J Sex Med.**, v. 18, n. 2, p. 423-429, 2021.

MONTORSI, F.; GUAZZONI, G.; STRAMBI LF, D.A.; POZZO, L.F.; NAVA, L.; BARBIERI, L. et al. Recovery of spontaneous erectile function after nerve-sparing radical retropubic prostatectomy with and without early intracavernous injections of alprostadil: results of a prospective, randomized trial. **J Urol.**, v. 158, n. 4, p. 1408-10, 1997.

MONTORSI, F.; BROCK, G.; LEE, J.; SHAPIRO, J.; VAN POPPEL, H.; GRAEFEN, M. et al. Effect of nightly versus on-demand vardenafil on recovery of erectile function in men following bilateral nerve-sparing radical prostatectomy. **Eur Urol.**, v. 54, n. 4, p. 924-31, 2008.

MONTORSI, F.; BROCK, G.; STOLZENBURG, J.U.; MULHALL, J.; MONCADA, I.; PATEL, H.R. et al. Effects of tadalafil treatment on erectile function recovery following bilateral nerve-sparing radical prostatectomy: a randomised placebo-controlled study (REACTT). **Eur Urol.**, v. 65, n. 3, p. 587-96, 2014.

MONTORSI, F.; GUAZZONI, G.; STRAMBI, L. F.; DA POZZO, L. F.; NAVA, L.; BARBIERI, L.; RIGATTI, P.; PIZZINI, G.; MIANI, A. Recovery of spontaneous erectile function after nerve-sparing radical retropubic prostatectomy with and without early intracavernous injections of alprostadil: results of a prospective, randomized trial. **J urol.**, v. 158, n. 4, 1408–1410, 1997.

MORELAND, R.B. Is there a role of hypoxemia in penile fibrosis: a viewpoint presented to the Society for the Study of Impotence. **Int J Impot Res.**, v. 10, n. 2, p. 113-20, 1998.

MULHALL, J.P. Defining and reporting erectile function outcomes after radical prostatectomy: challenges and misconceptions. **J Urol.**, v. 181, n. 2, p. 462-471, 2009.

MULHALL, J.P.; MÜLLER, A.; DONOHUE, J.F.; MULLERAD, M.; KOBYLARZ, K.; PADUCH, D.A. et al. The functional and structural consequences of cavernous nerve injury are ameliorated by sildenafil citrate. **J Sex Med.**, v. 5, n. 5, p. 1126-36, 2008.

MULHALL, J.P.; MORGENTALER, A. Penile rehabilitation should become the norm for radical prostatectomy patients. **J Sex Med.**, v. 4, n. 3, p. 538-43, 2007.

MULLERAD, M.; DONOHUE, J.F.; LI, P.S.; SCARDINO, P.T.; MULHALL, J.P. Functional sequelae of cavernous nerve injury in the rat: is there model dependency. **J Sex Med.**, v. 3, n. 1, p. 77-83, 2006.

NEHRA, A.; GOLDSTEIN, I.; PABBY, A.; NUGENT, M.; HUANG, Y.H.; DE LAS MORENAS, A. et al. Mechanisms of venous leakage: a prospective clinicopathological correlation of corporeal function and structure. **J Urol.**, v. 156, n. 4, p. 1320-9, 1996.

NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. **Jama**, v. 270, n. 1, p. 83-90, 1993.

PADMA-NATHAN, H.; MCCULLOUGH, A.R.; LEVINE, L.A.; LIPSHULTZ, L.I.; SIEGEL, R.; MONTORSI, F. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of postoperative nightly sildenafil citrate for the prevention of erectile dysfunction after bilateral nerve-sparing radical prostatectomy. **Int J Impot Res.**, v. 20, n. 5, p. 479-86, 2008.

PAN, F.; ZHANG, J.; LIU, Y.; LU, L.; QIU, X.; LV, K. et al. Intracavernosal Pressure Recording to Evaluate Erectile Function in Rodents. **J Vis Exp.**, [S.L.], n. 136, p. 56798, 2018.

PENSON, D.F.; FENG, Z.; KUNIYUKI, A.; MCCLERRAN, D.; ALBERTSEN, P.C.; DEAPEN, D. et al. General quality of life 2 years following treatment for prostate cancer: what influences outcomes? Results from the prostate cancer outcomes study. **J Clin Oncol.**, v. 21, n. 6, p. 1147-54, 2003.

PEARSE, D.D.; PEREIRA, F.C.; MARCILLO, A.E.; BATES, M.L.; BERROCAL, Y.A.; FILBIN, M.T. et al. cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. **Nat Med.**, v. 10, n. 6, p. 610-6, 2004.

PORST, H.; BURNETT, A.; BROCK, G.; GHANEM, H.; GIULIANO, F.; GLINA, S. et al. SOP conservative (medical and mechanical) treatment of erectile dysfunction. **J Sex Med.**, v. 10, n. 1, p. 130-71, 2013.

QUINLAN, D.M.; NELSON, R.J.; PARTIN, A.W.; MOSTWIN, J.L.; WALSH, P.C. The rat as a model for the study of penile erection. **J Urol.**, v. 141, n. 3, p. 656-61, 1989.

RAMBHATLA, A.; KOVANEZ, I.; FERRINI, M.; GONZALEZ-CADAVID, N.F.; RAJFER, J. Rationale for phosphodiesterase 5 inhibitor use post-radical prostatectomy: experimental and clinical review. **Int J Impot Res.**, v. 20, n. 1, p. 30-4, 2008.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **Faseb j.**, v. 22, n. 3, p. 659-61, 2008.

RODGER, J.; GOTO, H.; CUI, Q.; CHEN, P.B.; HARVEY, A.R. cAMP regulates axon outgrowth and guidance during optic nerve regeneration in goldfish. **Mol Cell Neurosci.**, v. 30, n. 3, p. 452-64, 2005.

SCHAAL, S.M.; GARG, M.S.; GHOSH, M.; LOVERA, L.; LOPEZ, M.; PATEL, M. et al. The therapeutic profile of rolipram, PDE target and mechanism of action as a neuroprotectant following spinal cord injury. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e43634, 2012.

SALONIA, A.; BURNETT, A.L.; GRAEFEN, M.; HATZIMOURATIDIS, K.; MONTORSI, F.; MULHALL, J.P. et al. Prevention and management of postprostatectomy sexual dysfunctions. Part 1: choosing the right patient at the right time for the right surgery. **Eur Urol.**, v. 62, n. 2, p. 261-72, 2012.

SALMASI, A.; LEE, G.T.; PATEL, N.; GOYAL, R.; DINIZO, M.; KWON, Y.S. et al. Off-Target Effect of Sildenafil on Postsurgical Erectile Dysfunction: Alternate Pathways and Localized Delivery System. **J Sex Med.**, v. 13, n. 12, p. 1834-43, 2016.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol.**, v. 182, n. 3, p. 311-22, 2000.

SEGAL, R.; BURNETT, A.L. Erectile preservation following radical prostatectomy. **Ther Adv Urol.**, v. 3, n. 1, p. 35-46, 2011.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; FUCHS, H.E.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2022. **CA Cancer J Clin.**, v. 72, n. 1, p. 7-33, 2022.

SIRAD, F.; HLAING, S.; KOVANECZ, I.; ARTAZA, J.N.; GARCIA, L.A.; RAJFER, J. et al. Sildenafil promotes smooth muscle preservation and ameliorates fibrosis through modulation of extracellular matrix and tissue growth factor gene expression after bilateral cavernosal nerve resection in the rat. **J Sex Med.**, v. 8, n. 4, p. 1048-60, 2011.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin.**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TELOKEN, P.; MESQUITA, G.; MONTORSI, F.; MULHALL, J. Post-radical prostatectomy pharmacological penile rehabilitation: practice patterns among the international society for sexual medicine practitioners. **J Sex Med.**, v. 6, n. 7, 2032-8, 2009.

UCKERT, S.; MAYER, M.E.; STIEF, C.G.; JONAS, U. The future of the oral pharmacotherapy of male erectile dysfunction: things to come. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 12, n. 2, p. 219-28, 2007.

UCKERT, S.; HEDLUND, P.; ANDERSSON, K.E.; TRUSS, M.C.; JONAS, U.; STIEF, C.G. Update on phosphodiesterase (PDE) isoenzymes as pharmacologic targets in urology: present and future. **Eur Urol.**, v. 50, n. 6, p. 1194-207, 2006.

USER, H.M.; HAIRSTON, J.H.; ZELNER, D.J.; MCKENNA, K.E.; MCVARY, K.T. Penile weight and cell subtype specific changes in a post-radical prostatectomy model of erectile dysfunction. **J Urol.**, v. 169, n. 3, p. 1175-9, 2003.

VIGNOZZI, L.; FILIPPI, S.; MORELLI, A.; AMBROSINI, S.; LUCONI, M.; VANNELLI, G.B. et al. Effect of chronic tadalafil administration on penile hypoxia induced by cavernous neurotomy in the rat. **J Sex Med.**, v. 3, n. 3, p. 419-31, 2006.

WEYNE, E.; ILG, M.M.; CAKIR, O.O.; MUNEEER, A.; ROUSSEL, D.B.; ALBERSEN, M. et al. European Society for Sexual Medicine Consensus Statement on the Use of the Cavernous Nerve Injury Rodent Model to Study Postradical Prostatectomy Erectile Dysfunction. **Sex Med.**, v. 8, n. 3, p. 327-37, 2020.

WEYNE, E.; MULHALL, J.; ALBERSEN, M. Molecular pathophysiology of cavernous nerve injury and identification of strategies for nerve function recovery after radical prostatectomy. **Curr Drug Targets.**, v. 16, n. 5, p. 459-73, 2015.

XU, Y.; XIN, H.; WU, Y.; GUAN, R.; LEI, H.; FU, X. et al. Effect of icariin in combination with daily sildenafil on penile atrophy and erectile dysfunction in a rat model of bilateral cavernous nerves injury. **Andrology**, v. 5, n. 3, p. 598-605, 2017.

YAFI, F.A.; JENKINS, L.; ALBERSEN, M.; CORONA, G.; ISIDORI, A.M.; GOLDFARB, S. et al. Erectile dysfunction. **Nat Rev Dis Primers.**, v. 2, p. 16003, 2016.

ZHANG, L.; ZHANG, Z.; ZHANG, R.L.; CUI, Y.; LAPOINTE, M.C.; SILVER, B. et al. Tadalafil, a long-acting type 5 phosphodiesterase isoenzyme inhibitor, improves neurological functional recovery in a rat model of embolic stroke. **Brain Res.**, v. 1118, n. 1, p. 192-8, 2006.

ZHANG, R.; WANG, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; TSANG, W.; LU, M. et al. Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. **Stroke**, v. 33, n. 11, p. 2675-80, 2002.

ANEXO A – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do papel do inibidor de fosfodiesterase do tipo 4 e sua associação com inibidor de fosfodiesterase do tipo 5 na recuperação da função erétil em ratos submetidos à lesão do nervo cavernoso", protocolada sob o CEUA nº 5884141218 (ID 001264), sob a responsabilidade de **Ricardo Reges Maia de Oliveira e equipe; Bruno Lima Linhares** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 10/09/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the role of phosphodiesterase type 4 inhibitor and its association with phosphodiesterase type 5 inhibitor in the recovery of erectile function in rats submitted to cavernous nerve injury", utilizing 40 Heterogenics rats (40 males), protocol number CEUA 5884141218 (ID 001264), under the responsibility of **Ricardo Reges Maia de Oliveira and team; Bruno Lima Linhares** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 09/10/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2019](#) a [06/2020](#) Área: [Departamento de Cirurgia](#)

Origem: [Biotério Prof. Eduardo Torres \(setorial FAMED\)](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [12 a 12 semanas](#) N: [40](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [320 a 370 g](#)

Local do experimento: Laboratório do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (Universidade Federal do Ceará).

Fortaleza, 10 de setembro de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará