



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

HUMBERTO MONTORO CHAGAS

**GEL DE CELULOSE BACTERIANA COMO PRÓTESE PENIANA INJETÁVEL:  
estudo em coelhos**

Recife  
2020

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

C433g Chagas, Humberto Montoro.  
Gel de celulose bacteriana como prótese peniana injetável: estudo em coelhos / Humberto Montoro Chagas. – 2020.  
49 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Salvador Vilar Correia Lima.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2020.  
Inclui referências.

1. Disfunção erétil. 2. Biocompatibilidade. 3. Pênis. 4. Prótese. I. Lima, Salvador Vilar Correia (Orientador). II. Título.

617.91 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2021-039)

HUMBERTO MONTORO CHAGAS

**GEL DE CELULOSE BACTERIANA COMO PRÓTESE PENIANA INJETÁVEL:  
estudo em coelhos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

**Área de concentração:** Cirurgia Clínica e Experimental

**Orientador:** Prof. Dr. Salvador Vilar Correia de Lima

**Coorientador:** Prof. Dr. Amanda Vasconcelos de Albuquerque

Recife  
2020

HUMBERTO MONTORO CHAGAS

**GEL DE CELULOSE BACTERIANA COMO PRÓTESE PENIANA INJETÁVEL:  
estudo em coelhos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

Aprovada em: 24/01/2020.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profº. Dr. (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profº. Dr. (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profº. Dr. (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profº. Dr. (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta Tese à minha  
*Família e amigos.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, ao amigo *Profº. Dr. Salvador Vilar Correia Lima* e à *Profª. Drª. Amanda Vasconcelos de Albuquerque*, pela dedicação e paciência.

À *Profª. Drª. Mariana Lira*, por todo trabalho na consultoria na análise dos resultados histológicos.

Ao Andreson e Sidcley pela preparação da histológica.

À *Dra. Rafaela de Siqueira Ferraz*, pela ajuda na organização e formatação da tese.

Agradecimento a todos que fazem NCE em especial aos Veterinários Joaquim e Adriana, e também ao Sr. Paulo e o acadêmico Caio que cuidou muito bem dos animais na minha ausência.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade de obter e/ou manter uma ereção com rigidez peniana suficiente para uma atividade sexual satisfatória. A DE é uma patologia que apresenta inúmeras opções de tratamento aprovados, que envolvem desde fármacos orais na forma de inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5i) até abordagens terapêuticas de segunda e terceira linhas como injeção intracavernosa com agentes vasodilatadores, dispositivos de ereção a vácuo, supositórios intrauretrais com prostaglandinas e implantes cirúrgicos de próteses penianas. As próteses penianas são a terceira opção no tratamento da DE, no entanto, apesar da sua comprovada eficácia, a infecção, o custo elevado, a idade avançada e as comorbidades são as principais razões para limitar o uso dessa modalidade de tratamento. Assim, o desafio deste trabalho consistiu em injetar no corpo cavernoso de coelhos orquiectomizados o gel de celulose bacteriana (CB). Estudos clínicos e pré-clínicos utilizando o CB como agente de preenchimento, demonstram sua biocompatibilidade e capacidade de biointegração com desenvolvimento de neovascularização. Além disso, por se tratar de um polímero que utiliza como matéria prima a cana-de-açúcar, possui um baixo custo de obtenção e um fácil manuseio. Desta forma, o objetivo desse trabalho consistiu em avaliar a eficácia da injeção intracavernosa do CB no tratamento da DE em modelo experimental de coelho. Trinta coelhos adultos foram distribuídos em três grupos, com dez animais cada, sendo: CB; Veículo e o Controle. Cada grupo foi então subdividido de acordo com o tempo de avaliação de 3 meses e 6 meses. A orquiectomia bilateral foi realizada 3 semanas antes da injeção. Medidas paquimétricas do eixo peniano, diâmetro e comprimento foram realizadas *in situ*. Análises morfométricas histológicas do corpo cavernoso (CC), espessura da túnica albugínea, densidade celular, fibras colágenas e elásticas pós-injeção também foram realizadas, além de imuno-histoquímica para vasos neoformados. O implante de CB, aumentou tanto o comprimento como a espessura do pênis após 3 e 6 meses da última injeção, com consequente aumento do diâmetro do CC. Em contrapartida, isso não foi observado nos grupos Controle e Veículo, confirmando a castração, com degradação deste tecido e a eficácia do CB. Esses resultados associados com a neovascularização e a ocupação pelo CB dentro dos corpos cavernosos até o período de 6 meses sugere não só uma boa integração tecidual como uma biocompatibilidade e com ausência de degradação ou perda de volume. Assim, o CB apresenta-se como um agente de preenchimento seguro para DE em coelhos, funcionando como uma opção de tratamento ambulatorial bem tolerado, clinicamente durável, minimamente invasiva e de baixo custo.

Palavras-chave: Disfunção erétil. Biocompatibilidade. Pênis. Prótese.

## SUMMARY

Erectile dysfunction (ED) is defined as the inability to obtain and/or maintain an erection with sufficient penile stiffness for satisfactory sexual activity. ED is a pathology that presents numerous approved treatment options, ranging from oral drugs in the form of phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE5i) to second and third line therapeutic approaches such as intracavernous injection with vasodilating agents, vacuum erection devices, intraurethral suppositories with prostaglandins and surgical penile prosthesis implants. Penile prostheses are the third option in the treatment of ED, however, despite their proven efficacy, infection, high cost, advanced age and comorbidities are the main reasons to limit the use of this modality of treatment. Thus, the challenge of this study was to inject the bacterial cellulose (CB) gel into the corpus cavernosum of orchiectomized rabbits. Clinical and pre-clinical studies using CB as a filling agent demonstrate its biocompatibility and biointegration capacity with neovascularization development. Moreover, as it is a polymer that uses sugar cane as a raw material, it has a low cost and easy handling. Thus, the objective of this study was to evaluate the efficacy of intracavernous injection of CB in the treatment of ED in an experimental rabbit model. Thirty adult rabbits were distributed in three groups, with ten animals each: CB; Vehicle and Control. Each group was then subdivided according to the evaluation time of 3 months and 6 months. Bilateral orchiectomy was performed 3 weeks before the injection. Pachymetric measurements of the penile axis, diameter and length were performed in situ. Histological morphometric analysis of the corpus cavernosum (CC), thickness of the tunica albuginea, cell density, collagen fibers and post injection elastics were also performed, as well as immunohistochemistry for neoformed vessels. The CB implant increased both the length and thickness of the penis after 3 and 6 months of the last injection, with a consequent increase in the diameter of the CC. In contrast, this was not observed in the Control and Vehicle groups, confirming the castration, with degradation of this tissue and the effectiveness of CB. These results associated with neovascularization and occupation by CB within the corpora cavernosa up to 6 months suggest not only good tissue integration but also biocompatibility and with no degradation or loss of volume. Thus, CB presents itself as a safe filling agent for ED in rabbits, functioning as a well tolerated outpatient treatment option, clinically durable, minimally invasive and low cost.

Keywords: Erectile dysfunction. Materials Testing. Penile. Artificial Limbs.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Técnica cirúrgica de orquiectomia (A-B) seguida de liberação do frênulo peniano de coelho (C-D)                                                                                                                                                                                           | 26 |
| Figura 2 – Paquimetria antes e após injeção de CB/salina                                                                                                                                                                                                                                             | 27 |
| Figura 3 – Aspecto clínico e histológico do pênis do coelho, após injeção intracavernosa de CB                                                                                                                                                                                                       | 31 |
| Figura 4 – Secções transversais do pênis após a eutanásia dos animais veículo (A) e CB (B) após 6 meses. Em C observa-se fotomicrografia do corte panorâmico dos corpos cavernosos, completamente preenchidos por CB, envoltos pela túnica albugínea e com preservação do corpo esponjoso e urotélio | 33 |
| Figura 5 – Diâmetro dos corpos cavernosos entre os grupos controle; veículo: salina e gel de celulose bacteriana após 6 meses de implante. Valores testados quanto à normalidade. Diferenças estatística = * quando valor de $P \leq 0.005$ após One-way ANOVA                                       | 34 |
| Figura 6 – Integração do gel de celulose (CB) dentro dos corpos cavernosos após 3 (A e B) e 6 meses (C e D). U = urotélio, ta = túnica albugínea; CG = gel de celulose, GMC = célula gigante multinucleada. Fotomicrografia A e C coradas com Tricrômico de Masson e B e D com Hematoxilina e Eosina | 35 |
| Figura 7 – Deposição de fibras elásticas no grupo CB após 3 meses (A-B) e 6 meses (C-D). Figuras A e C coradas com coloração de Weigert e B e D coradas com Picrosirius Red e fotomicrografadas em microscópio de luz polarizada                                                                     | 36 |
| Figura 8 – Espessura da túnica albugínea entre os grupos controle; veículo: salina e gel de celulose bacteriana (CB) após 6 meses de implante                                                                                                                                                        | 37 |
| Figura 9 – Imunohistoquímica de cortes transversais do corpo cavernoso preenchido com CB e corados com Anti-CD31 para células endoteliais após 3 e 6 meses de implante, respectivamente A e B.                                                                                                       | 37 |

## **LISTA DE TABELAS**

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Comprimento e espessura peniana após injeção de CB       | 32 |
| Tabela 2 – Efeito bulking do CB no corpo cavernoso                  | 33 |
| Tabela 3 – Resposta inflamatória e neovascularização do implante CB | 34 |

## SUMÁRIO

|              |                                                                               |           |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                             | <b>12</b> |
| <b>2</b>     | <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>                                                  | <b>14</b> |
| 2.1          | ANATOMIA DO PÊNIS E MECANISMO DE EREÇÃO PENIANA                               | 14        |
| 2.2          | DISFUNÇÃO ERÉTIL                                                              | 15        |
| 2.3          | TRATAMENTO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL                                                | 16        |
| <b>2.3.1</b> | <b>Primeira Linha</b>                                                         | <b>16</b> |
| <b>2.3.2</b> | <b>Segunda Linha</b>                                                          | <b>17</b> |
| <b>2.3.3</b> | <b>Terceira linha de tratamento - Implante cirúrgico de próteses penianas</b> | <b>17</b> |
| 2.4          | DESCRIÇÃO DO GEL DE CELULOSE BACTERIANO                                       | 20        |
| 2.5          | MODELO EXPERIMENTAL                                                           | 22        |
| 2.6          | JUSTIFICATIVA                                                                 | 23        |
| 2.7          | OBJETIVOS                                                                     | 23        |
| <b>2.7.1</b> | <b>Objetivo geral</b>                                                         | <b>23</b> |
| <b>2.7.2</b> | <b>Objetivos específicos</b>                                                  | <b>23</b> |
| <b>3</b>     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                    | <b>25</b> |
| 3.1          | INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES DA PESQUISA                                        | 25        |
| 3.2          | ANIMAIS                                                                       | 25        |
| 3.3          | PROCEDIMENTOS TÉCNICOS                                                        | 25        |
| <b>3.3.1</b> | <b>Anestesia e cirurgia</b>                                                   | <b>25</b> |
| <b>3.3.2</b> | <b>Sacrifício e coleta da amostra</b>                                         | <b>27</b> |
| <b>3.3.3</b> | <b>Análise histológica</b>                                                    | <b>27</b> |
| 3.3.3.1      | <i>Imunohistoquímica</i>                                                      | 28        |
| 3.3.3.2      | <i>Histomorfometria</i>                                                       | 29        |
| 3.4          | DADOS ESTATÍSTICOS                                                            | 30        |
| 3.5          | PROCIMENTOS ÉTICOS                                                            | 30        |
| <b>4</b>     | <b>RESULTADOS</b>                                                             | <b>31</b> |
| 4.1          | ASPECTO CLÍNICO DO ANIMAL E AVALIAÇÃO DO PÊNIS AO LONGO DO TRATAMENTO COM CB  | 31        |
| 4.2          | AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO E ESPESSURA PENIANA “IN SITU”                        | 32        |
| 4.3          | AVALIAÇÃO DO PREENCHIMENTO DO CORPO CAVERNOSO                                 | 32        |

|       |                                                         |    |
|-------|---------------------------------------------------------|----|
| 4.3.1 | Efeito <i>bulking</i> do CB após 3 e 6 meses de injeção | 32 |
| 4.3.2 | Morfometria dos corpos cavernosos                       | 33 |
| 4.3.3 | Densidade celular e reação de corpo estranho            | 34 |
| 4.4   | HISTOQUÍMICA DE FIBRAS ELÁSTICAS                        | 35 |
| 4.5   | ESPESSURA DA TÚNICA ALBUGÍNEA                           | 36 |
| 4.6   | IMUNOHISTOQUÍMICA PARA NEOVASCULARIZAÇÃO DO<br>IMPLANTE | 37 |
| 5     | DISCUSSÃO                                               | 38 |
| 6     | CONCLUSÕES                                              | 42 |
|       | REFERÊNCIAS                                             | 43 |

## 1 INTRODUÇÃO

A disfunção erétil (DE), também conhecida como impotência sexual, é definida segundo o Consenso do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH) sobre Impotência, como a incapacidade de obter e/ou manter uma ereção com rigidez peniana suficiente para uma atividade sexual satisfatória<sup>1</sup>. A DE é uma preocupação comum dos pacientes e de seus parceiros, pois pode causar ansiedade, depressão e afetar significativamente a qualidade de vida. Atualmente, estima-se que metade de todos os homens com idade entre 40 e 70 anos apresentam algum grau desta disfunção. A prevalência da DE na população masculina varia de 10% em homens entre 30 e 39 anos, com prevalência de aumento para 59% em homens entre 70 e 79 anos<sup>2-4</sup>.

A DE é uma patologia que apresenta inúmeras opções de tratamento aprovados, entretanto essas terapias apresentam limitações em relação a sua segurança e eficácia, uma vez que cada modalidade de tratamento aprovado apresenta resultados variados em qualidade de vida e funcionais<sup>5</sup>.

As alternativas terapêuticas atuais envolvem como opção de primeira linha os fármacos orais na forma de inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5i), como o sildenafil (Viagra), vardenafil (Levitra), tadalafil (Cialis) entre outros<sup>6-8</sup>. No geral, o tratamento com qualquer um desses inibidores da PDE5i permite que aproximadamente 65% dos homens retornem à relação sexual<sup>1</sup>. Entretanto, esses medicamentos têm eficácia variável, especialmente em populações de difícil tratamento, como homens com diabetes *mellitus* (DM) ou com disfunção erétil após prostatectomia radical. Esses medicamentos têm efeitos colaterais significativos, que impedem que homens com múltiplas comorbidades participem de seu uso e os forçam a buscar modalidades mais invasivas de tratamento com DE<sup>9-18</sup>. As abordagens terapêuticas de segunda e terceira linhas incluem injeção intracavernosa com agentes vasodilatadores, dispositivos de ereção a vácuo, supositórios intrauretrais com prostaglandinas e implantes cirúrgicos de próteses penianas. No entanto, a terapia de segunda linha tem meia-vida curta e requer doses repetidas, o que torna a eficácia variável. Em adição, a terapia de terceira linha (prótese peniana) por se tratar de um procedimento invasivo, apresenta algumas desvantagens, tais como: dor moderada entre 1 e 2 semanas após realização da cirurgia, o intercursos sexual em média só

pode ser realizado de 6 a 8 semanas depois da operação e apresenta uma taxa de complicação que varia de 2 a 10%, principalmente decorrente de infecção, extrusão da prótese ou falha no dispositivo erétil das próteses penianas infláveis<sup>2,3,10-23</sup>. Além de todo o gasto com o procedimento cirúrgico em si, as próteses também são caras e consequentemente só são acessíveis a uma pequena parcela dos pacientes com disfunção erétil<sup>24</sup>. Assim, o principal desafio para terapia da DE consiste na busca contínua por opções de tratamento bem tolerados, clinicamente duráveis e minimamente invasivos.

Diante do exposto, o principal desafio deste trabalho consistiu em desenvolver um novo procedimento para o tratamento da disfunção erétil, a partir da injeção intracavernosa do gel de celulose bacteriana (CB) utilizando o coelho como modelo experimental. Por se tratar de um polímero que utiliza como matéria prima a cana-de-açúcar, possui um baixo custo de obtenção e um fácil manuseio, além de que os inúmeros dados de estudos clínicos e pré-clínicos do uso do CB demonstra sua biocompatibilidade e sua capacidade de biointegração com desenvolvimento de neovascularização<sup>25-31</sup>. Estudos anteriores relacionados à aplicação de gel de biopolímero, por meio de um implante endoscópico diretamente abaixo do colo da bexiga, para tratamento do refluxo vesico-ureteral, mostraram que o agente não apresentava reação inflamatória e que a longo prazo se integrou melhor ao tecido do hospedeiro quando comparado ao Deflux<sup>®</sup>, indicando não haver rejeição corporal desse material<sup>32</sup>. Em outra aplicação, testou-se o gel de polissacarídeo da celulose bacteriana na bexiga peritônio de ratos. O CB mostrou boa estabilidade permanecendo no lugar após a implantação, o que o caracterizou como uma substância de preenchimento satisfatória<sup>33</sup>.

Esses resultados associados às suas características físico químicas levaram os pesquisadores a investigar o seu uso em coelhos para melhorar as ereções penianas, introduzindo, assim, uma possível nova linha de tratamento para a DE.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ANATOMIA DO PÊNIS E MECANISMO DE EREÇÃO PENIANA

O pênis contém duas câmaras, chamadas corpos cavernosos, que se estendem ao longo de seu comprimento, na porção superior. A uretra, que é o canal por onde passam a urina e o ejaculado, se estende ao longo da parte inferior do corpo cavernoso<sup>34-37</sup>. O corpo cavernoso é preenchido por um tecido esponjoso que consiste de músculos lisos, tecidos fibrosos, espaços, veias e artérias. A túnica albugínea é uma membrana de tecido conjuntivo denso que recobre o corpo cavernoso. As veias localizadas na túnica albugínea drenam o sangue para fora do pênis, de volta para o corpo.

O mecanismo de ereção começa com o estímulo sexual, que pode ser tátil ou mental<sup>34-37</sup>. A estimulação sexual ou excitação sexual gera impulsos elétricos ao longo dos nervos que vão para o pênis e faz com que ocorra a liberação de óxido nítrico (NO), na verdade, isto requer uma interação complexa do sistema nervoso central, mediadores locais e endoteliais, a estimulação do nervo podendo causar uma ereção parassimpática reflexa através de uma ativação da via parassimpática pelos nervos pélvicos e fibras não-adrenérgicas não-colinérgicas (NANC). O óxido nítrico (NO) é o neurotransmissor liberado pelas fibras NANC. As fibras NANC desempenham um papel fundamental na obtenção da tumescência após a estimulação do sistema nervoso central, facilitando a liberação do NO e do polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e inibindo a liberação de noradrenalina das fibras simpáticas. O efeito cumulativo e a jusante é uma dilatação do músculo liso cavernoso e esponjoso através da ativação de segundos mensageiros intracelulares, como monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) e monofosfato de adenosina cíclico (cAMP)<sup>38</sup>. O cGMP faz com que os músculos lisos dos corpos cavernosos relaxem, permitindo o fluxo de sangue rápido para o pênis<sup>39,40</sup>. O sangue preenche os corpos cavernosos, tornando o pênis ereto. A expansão peniana pressiona e comprime os vasos sanguíneos que drenam o sangue para fora do pênis na túnica albugínea, mantendo o sangue dentro dos corpos cavernosos, sustentando assim a ereção. A ereção é revertida quando os níveis de cGMP nos corpos cavernosos diminuem, causando a contração da musculatura lisa dos corpos cavernosos, interrompendo o fluxo de sangue e

consequentemente a abertura dos vasos que drenam o sangue do pênis de volta ao corpo. Os níveis do cGMP diminuem nos corpos cavernosos após a sua degradação pela enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE5i)<sup>34-37</sup>. A função erétil dependente, portanto, da integridade da estrutura do corpo cavernoso e da interação e regulação funcional entre os agentes vasoativos neuroefetores e seus receptores. Qualquer desequilíbrio na proporção do tecido conjuntivo ou do músculo liso<sup>41</sup> ou, ainda, na transdução do sinal provocada por alterações na expressão do receptor podem resultar em disfunção erétil<sup>34-37</sup>.

## 2.2 DISFUNÇÃO ERÉTIL

A disfunção erétil (DE) pode ser conceituada como um comprometimento na fase de excitação da resposta sexual e é definida como a incapacidade consistente ou recorrente de atingir e/ou manter a ereção peniana suficiente para a uma relação sexual satisfatória<sup>1,2,6</sup>.

A DE pode ser de origem orgânica, psicogênica ou mista. As principais causas da orgânica são decorrentes de problemas neurológicos, vasculares, alterações penianas ou medicamentosas. Doenças neurológicas como Parkinson ou Alzheimer podem levar a DE devido a diminuição da libido ou por inibição para iniciar uma ereção. O envelhecimento como fator de risco ocorre devido a diminuição dos níveis de testosterona e mudança da estrutura vascular peniana. Medicamentos com ação central como os ansiolíticos, antidepressivos, antipsicóticos são frequentemente relacionados com piora da função sexual, bem como alguns antihipertensivos (diurético e betabloqueadores) e diversas drogas com ação antiandrogênica também podem levar à disfunção erétil<sup>9-17</sup>.

As causas psicogênicas da DE frequentemente é associada a fatores como ansiedade, falta da libido e/ou condições psiquiátricas como a depressão. Algumas vezes relatam ereções fora do intercuro sexual, como a presença de ereções noturnas<sup>18</sup>.

Por vezes a DE poderá ser um indicador precoce de doença crônica, Batty e colaboradores, estudando homens com e sem DE e diabetes *mellitus*, descobriram que homens com DE e diabetes são mais propensos a ter doença coronariana ou doença cerebrovasculares<sup>42</sup>. Outros fatores incluem trauma na região pélvica ou

genital, intervenções cirúrgicas, iatrogênicas, sedentarismo, hábitos alimentares inadequados, abuso de álcool, tabagismo e drogas ilícitas<sup>43</sup>.

Um dos principais estudos de epidemiologia sobre a DE foi o Massachusetts Male Age Study (MMAS), realizado entre 1987 e 1989 em uma amostra aleatória de 1.290 homens com idades entre 40 e 70 anos que moravam em cidades e vilas próximas a Boston, no Estado de Massachusetts, EUA, observaram que 52% dos homens tinham DE. As estimativas da prevalência de DE encontradas nesses estudos comparam-se às realizadas em outros continentes. Taxas semelhantes também foram encontradas na França, onde Virag e colaboradores<sup>44</sup>, relataram uma prevalência de 39% em homens de 18 a 70 anos; e na Tailândia, onde um estudo populacional em uma amostra de 1.250 homens com idades entre 40 e 70 anos mostrou uma prevalência de 37,5 %<sup>45</sup>. As diferenças entre as estimativas encontradas nos estudos citados podem ser reais e/ou podem surgir de diferenças culturais na população, percepção e atitude em relação à disfunção erétil entre as respectivas populações. Além disso, podem resultar da metodologia utilizada em cada pesquisa, uma vez que as técnicas e definições empregadas não foram padronizadas. Por outro lado, diferenças na faixa etária dos homens matriculados nas várias amostras podem ter levado a discrepâncias entre as taxas de DE encontradas. Porém, todos os estudos apontam como variável constante o aumento da incidência de DE com a idade<sup>45</sup>.

## 2.3 TRATAMENTO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL

### 2.3.1 Primeira Linha

Na década de 90, Jacob Rajfer e colaboradores, em 1992, descreveram a participação do Óxido Nítrico como mediador do relaxamento do corpo cavernoso em resposta à neurotransmissão não-adrenérgica e não-colinérgica (NANC), melhorando o mecanismo de ereção o que possibilitou o desenvolvimento de inibidores orais da fosfodiesterase-5 (PDE-5), como terapia oral para DE, como citrato de sildenafil, tadalafila, valdenafila e iodenafila. Atualmente, a terapia com esses inibidores é considerada de primeira linha para tratamento da DE, devendo ser utilizado sob demanda, na presença do desejo e do estímulo sexual<sup>8,46</sup>. O Guideline para DE, 2018, sugere o uso da psicoterapia ou aconselhamento psicosssexual para ajudar os homens a usar os medicamentos com mais eficácia<sup>2</sup>.

### **2.3.2 Segunda Linha**

Antes do aparecimento dos medicamentos orais para DE, os tratamentos eram limitados a drogas intrauretrais ou injeção intracavernosa de medicamentos vasoativos. Dentre os medicamentos utilizados estão o Alprotadil, a Papaverina, a Fentolamina, a Atropina e o Polipeptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) ou suas associações. Essas terapias estão indicadas na falha dos medicamentos orais ou pelas suas contraindicações. Destaca-se também nesta linha o tratamento com Vacuoterapia Constrictiva<sup>2,8</sup>.

### **2.3.3 Terceira linha de tratamento - Implante cirúrgico de próteses penianas**

As primeiras referências da impotência sexual registradas foram encontradas na Índia Sushruta Samihita por volta do século VIII a.C. Historicamente foi uma doença que se acreditava ter suas raízes psicogênicas, religiosas e sobrenaturais. Portanto, o tratamento da impotência envolveu poções, afrodisíacos, unguentos, orações, que, ainda hoje, desempenham um papel importante em certas culturas. Em meados de 1900 a impotência era tratada por psicólogos ou psiquiatras em mais de 95% das vezes, eles ofereciam empiricamente tratamento com testosterona. Em 1954 David Stafford-Clark descreveu no seu artigo “The Etiology and Treatment os Impotence” a seguinte afirmação: “Uma generalização dogmática, mas razoavelmente segura, seria que pelo menos 90% de todos os casos de impotência, relativos ou completos, são de origem psicogênica”. Antes de 1974, muito poucos urologistas eram envolvidos no diagnóstico e tratamento da disfunção erétil, devido ao desconhecimento da sua fisiopatologia<sup>47</sup>.

As primeiras próteses datam de 1936, quando os chineses tentaram usar hastes de marfim, a ideia básica era dotar o interior do pênis de um dispositivo que recuperasse sua rigidez peniana para facilitar a penetração. Inicialmente, Bogoras utilizou fragmentos de cartilagem intercostal introduzindo-os entre os corpos cavernosos para tal finalidade. No entanto o material usado, além de ser extremamente rígido, não podia ser devidamente mensurado para esta função, tendendo finalmente a ser absorvido com o passar do tempo<sup>48</sup>. Em 1948, Bergman e colaboradores, usando a técnica descrita por Bogoras e Frumpkim, faziam a cirurgia em 4 estágios para reconstrução peniana, mas, com o tempo e devido as complicações pós-operatórias, também foi abandonada<sup>49</sup>.

O primeiro implante, com relativo sucesso, empregando material sintético, foi descrito por Goodwin e Scott em 1952, em parceria com um dentista que tinha muita experiência com acrílico, produziu uma prótese peniana em acrílico para reconstrução do pênis. Seus estudos iniciais concluíram que o acrílico, quando introduzido nos tecidos, implantado entre fáscia de Buck e a túnica de dardos, provocava a formação de uma fina camada fibrosa ao seu redor, com um mínimo processo inflamatório. Apesar de alguns pacientes terem apresentado coitos satisfatórios, devido à rigidez do material essa técnica foi descontinuada. Em 1960 Loeffler, um cirurgião plástico em parceria com um urologista, Emile Sayegh, seguindo o conceito de Goodwin, também utilizou acrílico, porém foi pouco utilizada pelo mesmo motivo, mas eles utilizavam o acrílico somente na porção pendular do pênis, sendo uma experiência em dois casos apenas<sup>47</sup>.

A primeira aplicação de prótese, uma em cada corpo cavernoso, ocorreu em 1966, quando Beheri J. M descreveu sua técnica de implante, na qual eram utilizadas hastes sólidas de polietileno. Este também foi o primeiro relato do uso de próteses em toda a extensão do pênis, da glândula até a base dos corpos cavernosos, e não somente na sua porção pendular. Em 1966, após o relato de um trabalho em 700 pacientes tratados com esta técnica, apesar de obter sucesso no que dizia respeito à manutenção de uma atividade sexual satisfatória, este procedimento também foi abandonado, possivelmente porque a rigidez do material não era adequada a este propósito<sup>50</sup>. Foi Lash et al., que, em 1964, mostraram a versatilidade do uso do silicone, utilizado pela primeira vez para prótese peniana<sup>46,51</sup>.

Pearman, em 1967, seguindo a o princípio de Lash com silicone, descreveu uma técnica na qual eram realizadas incisões no dorso do pênis, entre a fáscia de Buck e a túnica albugínea, aonde poderiam ser inseridas próteses planas em sua porção superior e curvas na face da túnica albugínea, longas o suficiente para cobrirem a distância da região do sulco bálano prepucial até os ligamentos suspensores do pênis. Foi deixada de lado devido à dor, extrusão e ausência de uma área de apoio adequado na porção proximal<sup>46,52</sup>.

Gerow, em 1973, propôs uma prótese de silicone intra-cavernosa, que foram distribuídas comercialmente. Nesta ocasião ele implantava a prótese na porção pendular do pênis, com hastes bigeminadas. Também devido às complicações pós-operatórias do material também foi abandonada<sup>53</sup>.

No início de 1970 pouco interesse tinham os urologistas para o tratamento da disfunção erétil e isto foi demonstrado pelo baixo número de trabalhos apresentados nos Congressos da *American Urological Association*: em 1971 Pearman, um trabalho, em 1972 Morales, um trabalho, e em 1973 Hancock, um trabalho. Morales modificou a técnica de Beheri, usando um implante mais fino de polietileno. Porém, devido a rigidez do material, houve casos de perfuração e infecção e esse material também foi abandonado. Mas seu grupo ajudou no desenvolvimento das próteses peniana atuais. Em 1974 foram 3 trabalhos: Small e Carrion, com dois trabalhos e Scott, um trabalho, este último em relação a prótese peniana inflável<sup>47</sup>. A prótese de Small-Carrion deu origem a técnica do implante intracavernosa de próteses penianas semirrígidas, de silicone, que deram origem aos atuais modelos de prótese. Paralelamente, neste período, outros autores como Scott, Bradley e Timm iniciaram o desenvolvimento das próteses penianas infláveis, em 1973. Este princípio surgiu em 1969 com Timm, engenheiro, Bradley, neurologista e Scott com o desenvolvimento de um dispositivo de compressão uretral. Daí surgiu o esfíncter uretral artificial, que viabilizou hoje a utilização não só destes dispositivos, com boa margem de confiabilidade, bem como possibilitou o aparecimento das mais modernas técnicas que reúnem todos os circuitos em uma só peça<sup>47,54-56</sup>.

O implante peniano implica na substituição do mecanismo de ereção natural do corpo por um sistema de ereção artificial. Houve uma grande evolução nessa área nos últimos anos e hoje há diversos tipos de próteses disponíveis no mercado. Há implantes que são formados por um tubo de silicone semiflexível e uma haste interna de platina ou prata que mantém determinada tensão no pênis, há implantes articuláveis e também implantes que são formados por um sistema inflável em que o pênis fica ereto ou perde a ereção controlado por um dispositivo hidráulico de transmissão de pressão. O implante peniano é sempre feito em hospitais e é fundamental esclarecer antes ao paciente todos os detalhes básicos do procedimento, tais como a irreversibilidade da cirurgia devido à destruição dos tecidos cavernosos, a disponibilidade dos diversos tipos de prótese (vantagem e desvantagens de cada uma) bem como todos os cuidados a serem tomados antes e após o ato cirúrgico. Dentre as principais complicações associadas aos implantes penianos estão: hematomas, perfuração da albugínea do corpo cavernoso, lesão da uretra, retenção urinária, erros de tamanho dos cilindros ou hastes, fibrose, insatisfação com a

espessura, tamanho e rigidez do pênis, dor persistente, edema prolongado e infecção<sup>18,20-24</sup>.

## 2.4 DESCRIÇÃO DO GEL DE CELULOSE BACTERIANO

O gel de Celulose Bacteriano (CB) é um produto inovador da POLISA Biopolímeros para a Saúde Ltda. O CB é produzido a partir do biopolímero de melaço desenvolvido pela equipe de P&D e I da POLISA, obtido por síntese bacteriana, *Zoogloea* sp. Os primeiros estudos surgiram no final do século passado. Este biopolímero foi isolado no núcleo de Estação Experimental de Cana de Açúcar de Carpina, Universidade Federal Rural de Pernambuco. A identificação do microorganismo foi realizada no Instituto de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. A estrutura química do biopolímero puro foi determinada: Glicose 87,57%, Xilose 8,58%, Ribose 1,68%, Ácido Glicurônico 0,83%, Manose 0,82%, Arabinose 0,37%, Galactose 0,13%, Ramnose 0,01% e Fucose 0,01%<sup>57</sup>. Os primeiros experimentos para utilização deste biopolímero foi para abreviar a cicatrização de feridas em animais<sup>58</sup>. Dr. Melo, na sua tese de doutorado, avaliou a cinética de produção do biopolímero pela bactéria *Zoogloea* sp onde obteve uma taxa de conversão de 50%<sup>59</sup>. Posteriormente, avaliou-se a resposta citotóxica de macrófagos alveolares de ratos comparando com politetrafluoretileno (PTFE), telas de polipropileno e do biopolímero da cana-de-açúcar que mostrou alta biocompatibilidade, apresentando uma baixa citotoxicidade a um nível que permite a sua aplicação experimental com segurança<sup>26</sup>.

A resposta inflamatória à membrana de biopolímero e telas de polipropileno, um polímero sintético, implantadas no peritônio de ratos foi avaliada por Lima, em 2005. No estudo foi observado que em todos os ratos houve incorporação das próteses implantadas ao peritônio, não sendo encontradas coleções, exsudato livre ou fístulas, mostrando-se comparável ao polipropileno para a confecção de telas para próteses cirúrgicas<sup>29</sup>.

Esse biomaterial foi descrito em estudos prévios como um curativo seguro, com baixa toxicidade, biocompatível, promovendo crescimento e diferenciação celular e, portanto, contribuindo para o processo de cicatrização e epitelização. Estudos pré-clínicos e clínicos mostraram que esse biomaterial é efetivo como barreira mecânica

e adjuvante no tratamento de feridas cirúrgicas, e, em lesões ulcerativas, vem se mostrando bastante seguro e com baixo custo para uso em curativos urológicos<sup>60</sup>. Williams, em 1987, um biomaterial por definição é “uma substância ou associação de duas ou mais substâncias, farmacologicamente inertes, de origem natural ou sintética, utilizada para substituir, aumentar ou melhorar, parcial ou integralmente, tecidos e órgãos”<sup>61</sup>.

Outro estudo compara o biopolímero da cana-de-açúcar com Dextranomer Microspheres Plus Hyaluronic Acid, que já é utilizado na prática médica para o tratamento de refluxo vesíco-ureteral. Aqui o biopolímero confirma sua segurança de biocompatibilidade e integração local e com baixo custo<sup>32</sup>. O biopolímero foi usado como um material biocompatível para substituição óssea em ratos, mantendo a área uniforme, evitando o encolhimento cicatricial e preservando a aparência estética<sup>62</sup>. O biopolímero em forma de “hidrogel” mostrou-se efetivo para prevenir aderência intraperitoneal em modelo experimental em ratos, quando comparado com produtos já padronizados na prática médica para esse fim<sup>63</sup>. Foi também usado para substituir a nucleação orbitária em ratos que aqui também demonstrou ser biocompatível e bem integrado nas órbitas<sup>64</sup>. Em modelo experimental para lesões de pele o biopolímero da cana-de-açúcar mostrou uma integração da película de polissacarídeo celulósico ao tecido, com biocompatibilidade e baixa reatividade da pele. Essa remodelação de tecido induzida acelerou o processo de cicatrização e atuou como barreira mecânica<sup>65</sup>.

Outro estudo comparou uma substituição parcial da artéria femoral em cão, com “patch” de biopolímero da cana-de-açúcar e o uso de PTFE, mostrando que sua compatibilidade é semelhante entre os dois materiais, porém o primeiro com menor custo<sup>66</sup>. Um outro estudo experimental, onde foi avaliado a integração de uma membrana de biopolímero da cana-de-açúcar na orelha média de ratos, foi observado que a membrana do biopolímero da cana-de-açúcar provocou reação inflamatória na orelha média dos ratos com remissão no tempo tardio do experimento<sup>67</sup>. O gel de biopolímero CB foi testado experimentalmente em coelhos após evisceração ocular e preenchendo a bolsa escleral com o gel, foi observado sua biocompatibilidade e integração nas órbitas<sup>64</sup>. O gel de polissacarídeo celulósico de cana-de-açúcar provou ser biocompatível e pode ser usado para remodelação de defeitos ósseos críticos associado ao osso liofilizado e fornecendo consistência

adequada para preencher defeitos ósseos e propriedades que facilitam a liberação de proteína controladora<sup>68</sup>. Uma faixa multiperfurada de biopolímero ou comparada com uma película de poliuretano já disponível comercialmente, TEGADERMR, mostrando ser uma alternativa altamente satisfatória e baixo custo para curativos em hipospádias<sup>69</sup>. Uma esponja de biopolímero da cana-de-açúcar foi usada experimentalmente como facilitador da hemostasia no trauma renal grau 4, experimental em ratos, sendo encontrado uma satisfatória eficiência na hemostasia renal no modelo experimental<sup>70</sup>.

Foi testado experimentalmente por Correia Lima e colaboradores, em 2017, em ratos para possível proteção uretral no implante esfíncter artificial, neste estudo comparou o silicone com a faixa de gel de celulose bacteriana (CB), este último ajudou na remodelação estrutural dos tecidos periuretrais com boa integração local melhorando os tecidos protetivos uretral<sup>71</sup>.

O CB pode ser classificado segundo a RDC 185 de 22 de outubro de 2001 como um produto médico invasivo cirurgicamente, de longo prazo, enquadrado na classe III. Nesse sentido, o CB apresenta características promissoras de se tornar uma possível prótese peniana, substituindo a ereção natural do corpo por uma artificial, através de um procedimento ambulatorial minimamente invasivo.

## 2.5 MODELO EXPERIMENTAL

De acordo com a forma e com sua constituição histológica, o pênis dos mamíferos é classificado em fibroelástico e músculo cavernoso. No pênis do tipo fibroelástico, durante a cópula observa-se um aumento do comprimento peniano com poucas modificações no diâmetro. É encontrado em bois, porcos e ratos. No cavalo, cão e coelho observa-se que durante a cópula ocorre aumento tanto do comprimento quanto do diâmetro, características do pênis do tipo músculo cavernoso que também é encontrado no homem. O coelho é um animal de exploração zootécnica e considerado também como animal de laboratório. Por apresentar um pênis com as características semelhantes ao pênis humano é utilizado em trabalhos experimentais servindo como modelo para o estudo de várias patologias que acometem os seres humanos como, por exemplo, a disfunção erétil<sup>72-74</sup>. O pênis do coelho é dividido em raiz ou porção fixa, corpo ou porção intermediária e glândula ou extremidade livre. A

raiz é formada pelos pilares (corpos cavernosos) e pelo bulbo do pênis (corpo esponjoso). O corpo se estende desde a raiz até a glândula e é formado pelo corpo cavernoso e esponjoso. A glândula é formada por corpo esponjoso<sup>72</sup>.

Histologicamente o pênis do coelho contém tecido erétil dispostos na forma de dois corpos cilíndricos dorsais denominados corpo cavernoso e corpo esponjoso. Este último é um pouco mais longo e se localiza ventralmente circundando a uretra. Essas duas estruturas são também envolvidas por uma fâscia peniana constituída de tecido conjuntivo denso fibroelástico, a túnica albugínea<sup>72,74,75</sup>.

Tendo em vista as inúmeras semelhanças anatômicas e histológicas do pênis de coelhos com o pênis humano, o coelho apresenta-se como um ótimo modelo de comparação aos humanos para o tratamento da disfunção erétil.

## 2.6 JUSTIFICATIVA

O agente expander, gel de CB, apresenta-se como uma possível prótese peniana minimamente invasiva, proporcionando uma recuperação cirúrgica mais rápida, menor tempo de internação e invariavelmente ocasionando uma redução de custo para o tratamento da disfunção erétil.

## 2.7 OBJETIVOS

### 2.7.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia da injeção intra-cavernosa do gel de celulose bacteriana (CB) no tratamento da disfunção erétil em modelo experimental de coelho.

### 2.7.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o aspecto clínico do animal e do pênis ao longo do tratamento com CB;
2. Avaliação do comprimento e diâmetro peniano "*in situ*" antes e após o implante com CB;
3. Avaliar o efeito de preenchimento (bulking) do CB após 3 e 6 meses de implante;

4. Avaliar a morfometria do corpo cavernoso e a espessura da túnica albugínea;
5. Analisar a densidade celular do implante e reação de corpo estranho;
6. Analisar a histoquímica das fibras colágenas e elásticas;
7. Avaliar a imunohistoquímica para vasos neoformados dentro do implante CB.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES DA PESQUISA

Trata-se de um projeto multicêntrico com a participação de diferentes instituições: a) Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em parceria com a empresa POLISA – Biopolímeros para a Saúde, Ltda: Produção do gel de biopolímero de cana-de-açúcar, ou gel de celulose bacteriana (BCG); b) Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE): Manutenção dos animais, cirurgia, tratamento com o BCG e sacrifício; c) Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA): Processamento histológico e análises histológicas, estereológicas e imunohistoquímicas; d) Departamento de Energia Nuclear – DEN: Esterilização do material.

#### 3.2 ANIMAIS

Estudo de intervenção ou experimental, prospectivo para o qual coelhos machos adultos da raça Nova Zelândia (n= 30), pesando em média 2,0 Kg. Os animais foram mantidos em um ambiente apropriado com acesso livre a bebidas e ração *ad libitum*. Os animais (n= 30) foram divididos em três grupos, com 10 animais por grupo, e nomeados da seguinte forma: Grupo Gel de celulose bacteriana – CB; Grupo Veículo – salina; Grupo Controle. Cada grupo foi então subdividido igualmente em dois, de acordo com o tempo de avaliação de 3 meses e 6 meses.

#### 3.3 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

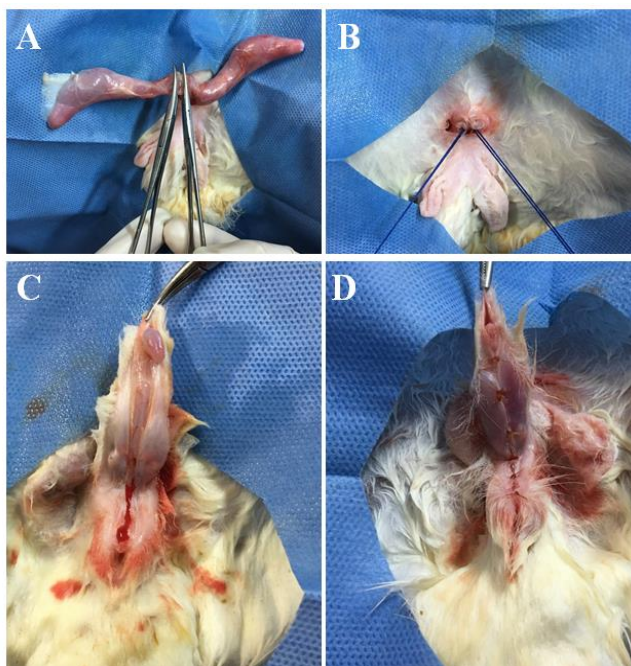
##### 3.3.1 Anestesia e cirurgia

Os animais dos grupos tratados e veículos foram anestesiados por um médico veterinário com Xilazina (5mg/kg IM) e Ketamina (20mg/kg IM). Dez minutos antes do início da anestesia foi aplicado sulfato de atropina por via intramuscular (0,44mg/Kg). Os animais foram mantidos com máscara de oxigênio (0,5 ml/min) durante todo o procedimento. Foi considerado anestesiado o animal com respiração regular e com ausência de reflexos a estímulos. Os coelhos foram posicionados em decúbito dorsal

na mesa cirúrgica (Figura 1), realizando-se assepsia e antissepsia do campo operatório e posicionando-se campos estéreis. A orquiectomia foi realizada bilateralmente no grupo tratado e veículo, através de uma única incisão supra púbica de cerca de 1 cm isolando o cordão e tracionando os testículos externamente. A ligadura do cordão foi realizada com fio algodão 3 zeros. O pênis do coelho foi liberado da sua prega natural após anestesia local com lidocaína 2% sem adrenalina até sua base, realizadas suturas das bordas com fio catgut cromado 4-0.

O grupo controle não foi castrado, sendo apenas o pênis desvinculado da sua prega natural, conforme mencionado acima.

Figura 1 – Técnica cirúrgica de orquiectomia (A-B) seguida de liberação do frênulo peniano de coelho (C-D).



Fonte: Autor, 2020

Três semanas após a orquiectomia, os animais do grupo experimental receberam 1mL de CB em cada corpo cavernoso com uma agulha de 26G, enquanto que os animais do grupo veículo receberam o mesmo volume de solução salina. Este procedimento foi realizado 4 vezes com intervalo de 1 semana. O comprimento e o diâmetro do pênis de cada animal foram medidos antes e depois de cada aplicação (Figura 2).

Figura 2 – Paquimetria antes e após injeção de CB/salina



Fonte: Autor, 2020

### 3.3.2 Sacrifício e coleta da amostra

Ao final de três e seis meses os animais foram eutanasiados através da administração por via intravenosa de dose letal de tiopental sódio (150mg/Kg).

O pênis foi então removido na sua totalidade por dissecção, separando-o de seu ponto de fixação na tuberosidade isquiática. O pênis foi pesado seco em uma balança analítica e posteriormente fixado por imersão em formalina 10% em tampão fosfato 75nM. 24h após a fixação o pênis foi recortado em fragmentos transversais de aproximadamente 3-5mm de espessura e pós-fixados na mesma solução.

### 3.3.3 Análise histológica

Todas as amostras foram processadas rotineiramente seguindo a técnica de desidratação em álcool, diafanização em xileno e inclusão em parafina histológica. Cortes de 4  $\mu$ m de espessura foram obtidos, montados em lâminas e posteriormente corados de acordo com o objetivo de estudo. As lâminas coradas com HE foram utilizadas para aferição da espessura do corpo cavernoso e reação de corpo estranho seguida de análise morfométrica de densidade celular. A coloração de tricrômio de Masson foi utilizada para aferição da espessura da túnica albugínea. Finalmente a técnica de Fucsina-Resorcina de Weigert, assim como a técnica com Picrosirius Red foram utilizadas para visualização das fibras do sistema elástico e colágenos, respectivamente. Todas as foto micrografias foram obtidas utilizando-se o microscópio

AXIO (Imager.M<sup>2</sup>m/Zeiss) acoplado a uma câmera (AXIOCam HRc/Zeiss) conectada ao software de captura ZEN 2 PRO (blue edition), ZEISS nas objetivas de 10, 20 e 40x.

### 3.3.3.1 *Imunohistoquímica*

Para identificar a presença e a localização específica de vasos sanguíneos dentro do gel injetado nos corpos cavernosos nos grupos BCG 3 e 6 meses, empregaram-se recuperação antigênica enzimática, eliminação da peroxidase endógena, bloqueio de antígenos inespecíficos e marcação imunohistoquímica.

Para tanto, cortes histológicos foram imunomarcados com anticorpos anti-CD31 (Ab24590 *mouse monoclonal* Abcam® Lote 8065433 diluições 1:100).

Para recuperação antigênica, se utilizou solução de tripsina (0,01 g de tripsina + 0,01 g de cloreto de cálcio + 10 mL de água destilada) em câmara úmida, a 37°C por 30 minutos, e lavagem em três banhos de PBS por 2 min. A eliminação da peroxidase endógena foi feita em solução alcoólica de peróxido de hidrogênio (180 mL de metanol + 20 mL de peróxido de hidrogênio a 20%) por 20 min, em temperatura ambiente, protegida da luz, seguida de lavagem em três banhos com PBS, por 2 min cada. Para bloqueio de antígenos inespecíficos do tecido, empregou-se solução de leite desnatado diluído em PBS a 10%, por 30 min, em temperatura ambiente.

Na fase de marcação dos vasos, foram empregados controle positivo (tecido conjuntivo do animal), teste e controle negativo (sem anticorpo primário). Após lavagens em PBS, todas as lâminas (controles e teste) foram incubadas com o anticorpo secundário em câmara úmida, por 20 min a 36°C, seguindo lavagens em PBS e incubação com o reagente “C” por 15 min, a 36°C, e lavagens em PBS.

A revelação do complexo antígeno-anticorpo foi realizada com solução de diaminobenzidina (DAB, *Histostar plus*®, *Invitrogen*®), por 2 min. Para coloração nuclear de contraste, utilizou-se hematoxilina de Harris (diluída a 50% em água destilada), por 4 min. Em seguida as preparações seguiram a técnica de rotina mencionada acima para em seguida serem fotografadas.

### 3.3.3.2 Histomorfometria

Reação de corpo estranho: as medidas de intensidade da reação inflamatória foram realizadas por um observador cego e as lâminas foram selecionadas aleatoriamente. A avaliação microscópica objetivou registrar a presença de vasos sanguíneos, fibroblastos e células gigantes multinucleadas da coloração HE, em uma análise semiquantitativa. A intensidade da reação inflamatória foi classificada como ausente, leve, moderada e grave. Esta graduação foi baseada nos seguintes critérios [15]: 0-ausente, com menos de 5% da área examinada; 1-Leve, com reação envolvendo entre 5-25% da área examinada; 2-moderado, comprometendo entre 25-70%; Reação 3-Grave, envolvendo mais de 70% da área analisada.

A morfometria da espessura da túnica albugínea foi realizada em lâminas previamente coradas com Tricrômico de Masson e foto micrografadas em microscópio ótico. Vinte aferições foram realizadas em cada corpo cavernoso, totalizando 40 por animal, levando em consideração o último pixel marcado em azul entre o tecido e a região externa ao corte até o último pixel azul entre a túnica albugínea e a região interna do corpo cavernoso. Para esta análise utilizou-se o software Image J, com o auxílio da ferramenta “linha reta”, onde uma linha perpendicular ao sentido das fibras foi lançada. Ao final uma média foi obtida, bem como o desvio padrão para análise estatística.

As lâminas destinadas a marcação das fibras elásticas foram coradas através de coloração de Weigert. Após a montagem e secagem as lâminas foram foto micrografadas, obtendo-se 15 imagens aleatórias de cada espécime, e as imagens processadas através do software ImagePro Plus. Para isto, os pixels com a marcação para a fibra elástica foram selecionados e os resultados foram expressos em porcentagem de área ocupada nas imagens.

A integração inflamatória tecidual e a proliferação vascular foram avaliadas em lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina de forma quantitativa. Para isso utilizou-se o sistema de grades do software Image J. Uma malha de 42 pontos foi lançada em cada imagem obtida dentro dos corpos cavernosos (15 por animal), totalizando 630 pontos. Foram quantificados vasos sanguíneos, fibroblastos, células gigantes multinucleada (CGMN), macrófagos, células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares e a presença do CB. Ao final, foram obtidas as médias para cada tipo celular ou estrutura atingida pelos pontos, além do desvio padrão.

### 3.4 DADOS ESTATÍSTICOS

Registros biométricos e histomorfométricos foram utilizados para calcular a média e os valores de desvio padrão (DP) em cada grupo. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi escolhido para avaliação da distribuição normal. A análise de variância foi usada para avaliar os efeitos do tempo e das condições experimentais. Para análise das diferenças entre os grupos, foi realizada a *one-way* ANOVA seguido teste Tukey *post-hoc*. Para análise das diferenças de parâmetros entre 3 e 6 meses pós-injeção, as variáveis da curva normal foram comparadas pelo teste t, seguido pelo cálculo dos valores de P, considerando-se estatisticamente significativo valores  $\leq 0,05$ ). Para todas as análises, foi utilizado o software SigmaStat 3.5.

### 3.5 PROCIMENTOS ÉTICOS

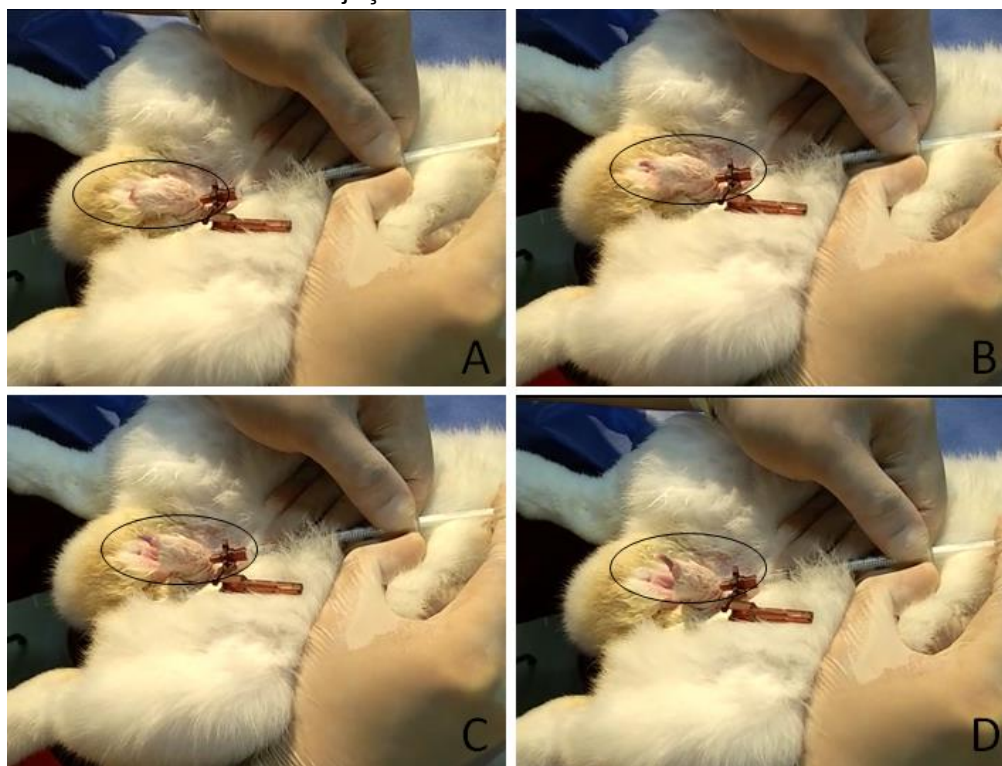
O projeto e o protocolo de pesquisa foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (N. 23076.022494/2015-90).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ASPECTO CLÍNICO DO ANIMAL E AVALIAÇÃO DO PÊNIS AO LONGO DO TRATAMENTO COM CB

Não houve complicações no procedimento da injeção intracavernosa em nenhum dos grupos. O tempo cirúrgico médio para injeção do CB ou salina foi de 5 minutos por animal. De maneira geral, alguns animais apresentaram uma resposta imediata da ereção induzida pelo CB, com exposição da glândula após a injeção (Figura 3). Em contrapartida, alguns animais não apresentaram uma distribuição homogênea ao longo do comprimento do corpo cavernoso, localizando-se em área isoladas e sem contiguidade. Após os tempos experimentais, 3 e 6 meses, os animais do grupo experimental estavam com a cicatrização completa e rigidez peniana palpável. Não foram observados sinais de hipersensibilidade, extrusão ou processos inflamatórios intensos após 6 meses, indicando assim que a injeção intracavernosa do CB é um procedimento seguro.

Figura 3 – Aspecto clínico e histológico do pênis do coelho, após injeção intracavernosa de CB



Fonte: Autor, 2020

## 4.2 AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO E ESPESSURA PENIANA “*IN SITU*”

Após a injeção intracavernosa do CB houve um aumento tanto do comprimento como do diâmetro peniano de  $41.04 \pm 1.61$  para  $49.96 \pm 0.68$  e de  $13.95 \pm 0.38$  para  $23.19 \pm 1.35$ , respectivamente, após o período de seis meses (Tabela 1). Esse aumento se manteve ao longo do tempo experimental, sem perdas de volume quando comparados os tempos de 3 e 6 meses (Tabela 1). Os coelhos que receberam o CB apresentaram uma recuperação da função erétil quando comparado aqueles que receberam injeções salinas. A figura 3 demonstra a integridade do corpo esponjoso e a preservação do urotélio.

Tabela 1 – Comprimento e espessura peniana após injeção de CB.

| Grupo    | Comprimento peniano (mm) |                  |                    | Diâmetro peniano (mm) |                  |                    |
|----------|--------------------------|------------------|--------------------|-----------------------|------------------|--------------------|
|          | T0                       | T3m              | T6m                | T0                    | T3m              | T6m                |
| Controle | $31.90 \pm 1.30$         | $36.56 \pm 4.21$ | $41.04 \pm 1.61^a$ | $11.03 \pm 1.31$      | $14.15 \pm 0.60$ | $13.95 \pm 0.38^a$ |
| Veículo  | $35.41 \pm 0.83$         | $35.56 \pm 1.14$ | $39.53 \pm 1.95^a$ | $14.59 \pm 0.68$      | $13.14 \pm 0.79$ | $14.93 \pm 0.79^a$ |
| CB       | $35.55 \pm 0.86$         | $36.04 \pm 0.87$ | $49.96 \pm 0.68^b$ | $11.03 \pm 1.31$      | $17.15 \pm 0.44$ | $23.19 \pm 1.35^b$ |

Valores apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Veículo: salina e CB: gel de celulose Bacteriana. T0, T3m e T6m (tempos experimentais antes as injeções, após 3 e 6 meses, respectivamente. Letras diferentes na mesma coluna =  $P < 0.05$  após One-way ANOVA test.

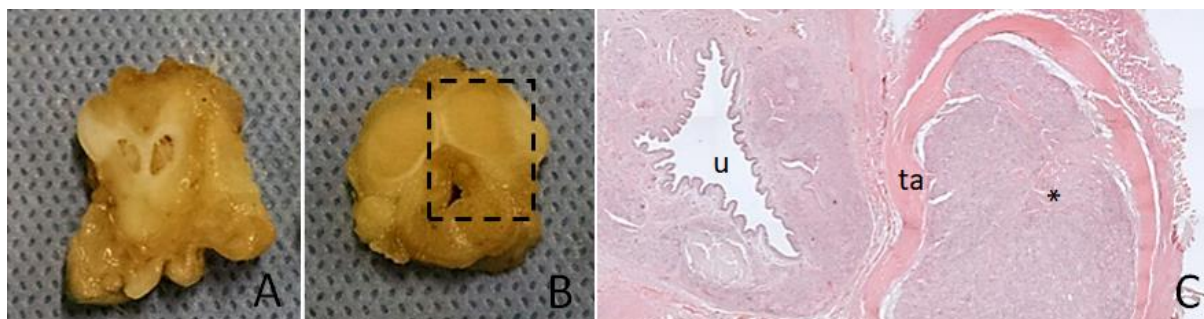
Fonte: Autor, 2020

## 4.3 AVALIAÇÃO DO PREENCHIMENTO DO CORPO CAVERNOSO

### 4.3.1 Efeito *bulking* do CB após 3 e 6 meses de injeção

A análise histológica pela coloração de Hematoxilina-eosina revelou o preenchimento do corpo cavernoso pelo CB com preservação dos constituintes teciduais. A figura 4 demonstra a integridade do corpo esponjoso e a preservação do urotélio. O CB permanece após os períodos de 3 e 6 meses acarretando efeito de massa e sendo incorporado ao tecido, permeado por infiltrado inflamatório predominantemente linfomononuclear, células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, fibroblastos e vasos sanguíneos (Tabela 2).

Figura 4 - Secções transversais do pênis após a eutanásia dos animais veículo (A) e CB (B) após 6 meses. Em C observa-se fotomicrografia do corte panorâmico dos corpos cavernosos, completamente preenchidos por CB, envoltos pela túnica albugínea e com preservação do corpo esponjoso e urotélio.



Fonte: Autor, 2020

Tabela 2 – Efeito bulking do CB no corpo cavernoso

| Grupos            | Corpo Cavernoso                                  | Corpo Esponjoso       |
|-------------------|--------------------------------------------------|-----------------------|
| Controle          | Score 3 vasos sanguíneos<br>Score 3 fibroblastos | Íntegro               |
| Veículo<br>(3-6m) | Score 3 vasos sanguíneos<br>Score 3 fibroblastos | Íntegro               |
| CB - 3m           | Score 3 CGMN<br>Score 2 vasos sanguíneos         | Score 1 mononucleares |
| CB - 6m           | Score 2 CGMN<br>Score 1 vasos sanguíneos         | Score 1 mononucleares |

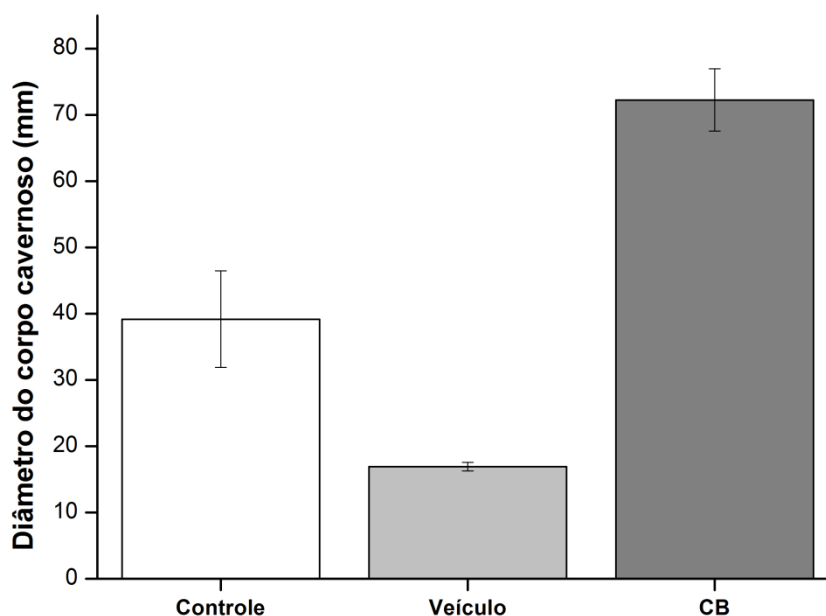
Valores apresentados como score de intensidade inflamatória onde 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderada e 3 = intensa. C Veículo: salina e CB: gel de celulose bacteriana. CGMN célula gigante multinucleada.

Fonte: Autor, 2020

#### 4.3.2 Morfometria dos corpos cavernosos

Posteriormente a orquiectomia foram observadas diferenças significativas no diâmetro dos corpos cavernosos (CC) do pênis, seguida ou não de preenchimento com o CB. Como esperado, ocorreu uma diminuição do diâmetro do CC no grupo veículo, confirmando os efeitos da ausência de andrógenos no tecido, bem como o aumento do diâmetro após o preenchimento com o gel de celulose. O efeito *bulking* novamente permaneceu no tecido, sem reabsorção, mesmo após 6 meses de injeção (Figura 4).

Figura 5 – Diâmetro dos corpos cavernosos entre os grupos controle; veículo: salina e gel de celulose bacteriana após 6 meses de implante. Valores testados quanto à normalidade. Diferenças estatística = \* quando valor de  $P \leq 0.005$  após One-way ANOVA.



Fonte: Autor, 2020

#### 4.3.3 Densidade celular e reação de corpo estranho

A integração e biocompatibilidade do CB após implante pode ser aferida de acordo com a celularidade e neovascularização. Como esperado, no grupo de 3 meses houve uma maior quantidade de vasos sanguíneos e fibroblastos. A resposta inflamatória mediada por células gigantes multinucleadas (CGMN), linfócitos, plasmócitos e polimorfonucleares permaneceu inalterada ao longo do tempo experimental (Tabela 3).

Tabela 3 – Resposta inflamatória e neovascularização do implante CB.

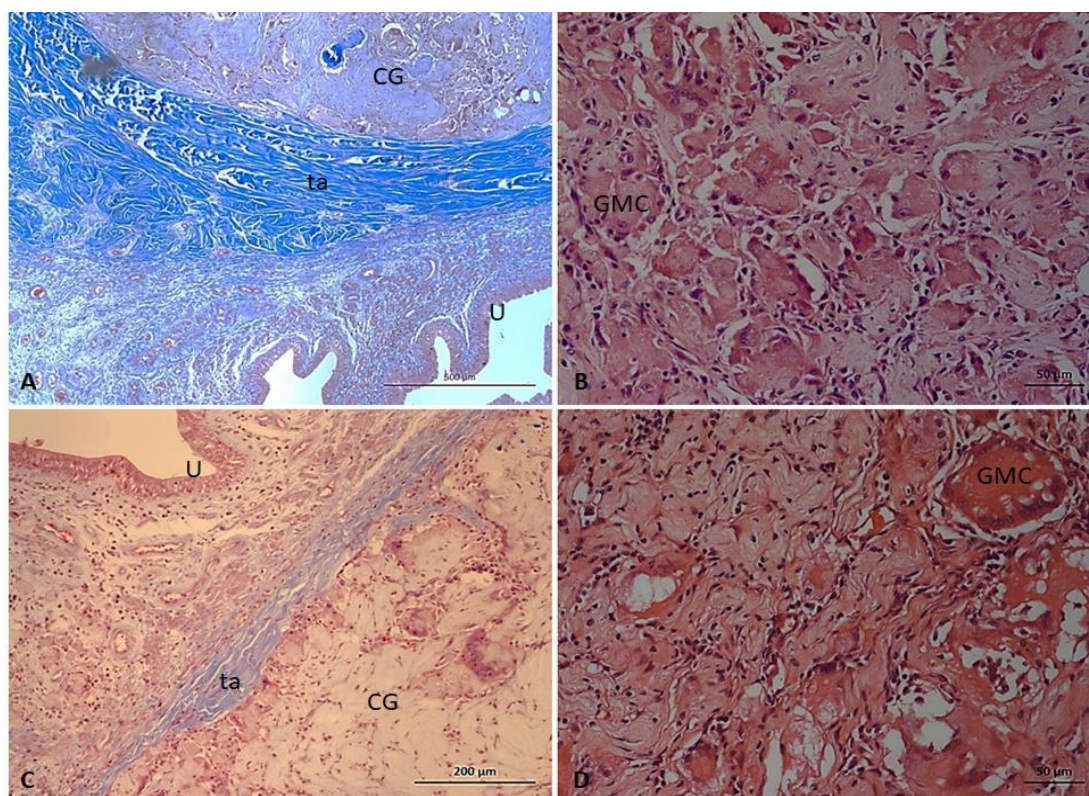
| Grupos  | VS (%)         | Fib (%)         | CGMN (%)         | Mac (%)         | Mono (%)       | Poli (%)       | CG (%)           |
|---------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|------------------|
| CB-3m   | 46.50<br>(2.1) | 82.25<br>(13.0) | 126.25<br>(20.0) | 84<br>(13.3)    | 19.75<br>(3.1) | 0.75<br>(0.12) | 303.75<br>(48.2) |
| CB-6m   | 20.80<br>(0.5) | 23.4<br>(3.7)   | 87.4<br>(13.8)   | 185.4<br>(29.4) | 12.4<br>(1.9)  | 0.2<br>(0.03)  | 318<br>(50.4)    |
| P-value | 0.042          | 0.001           | 0.137            | 0.025           | 0.132          | 0.413          | 0.772            |

Valores apresentados como média (%) em um total de 630 pontos contados (100%). P-valeu: test t. VS: vaso sanguíneo; Fib: fibroblastos, CGMN: células gigantes multinucleadas; Mac: macrófagos; Mono: leucócitos mononucleares; Poli: leucócitos polimorfonucleares; CG: gel de celulose.

Fonte: Autor, 2020

A densidade volumétrica ocupada pelo CB dentro dos corpos cavernosos mostrou-se constante nos 2 períodos analisados, demonstrando a eficácia do material como agente de preenchimento e sua boa integração ao tecido hospedeiro, com ausência de degradação ou perda de volume (Figura 6).

Figura 6 – Integração do gel de celulose (CB) dentro dos corpos cavernosos após 3 (A e B) e 6 meses (C e D). U = urotélio, ta = túnica albugínea; CG = gel de celulose, GMC = célula gigante multinucleada. Fotomicrografia A e C coradas com Tricrômico de Masson e B e D com Hematoxilina e Eosina.

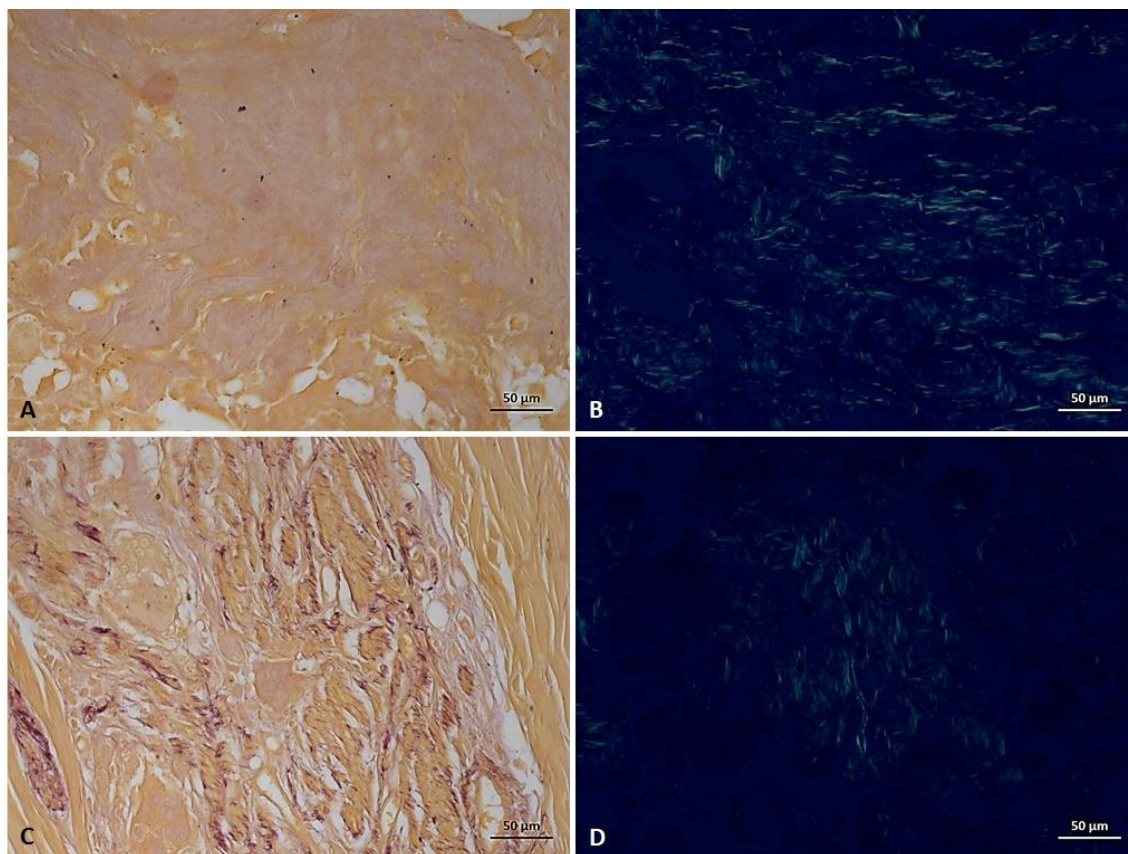


Fonte: Autor, 2020

#### 4.4 HISTOQUÍMICA DE FIBRAS ELÁSTICAS

A deposição de fibras elásticas aumentou ao longo do tempo experimental, mas sem diferenças estatísticas referentes à sua deposição (Figuras 7).

Figura 7 – Deposição de fibras elásticas no grupo CB após 3 meses (A-B) e 6 meses (C-D).  
Figuras A e C coradas com coloração de Weigert e B e D coradas com Picrosirius Red e  
fotomicrografadas em microscópio de luz polarizada

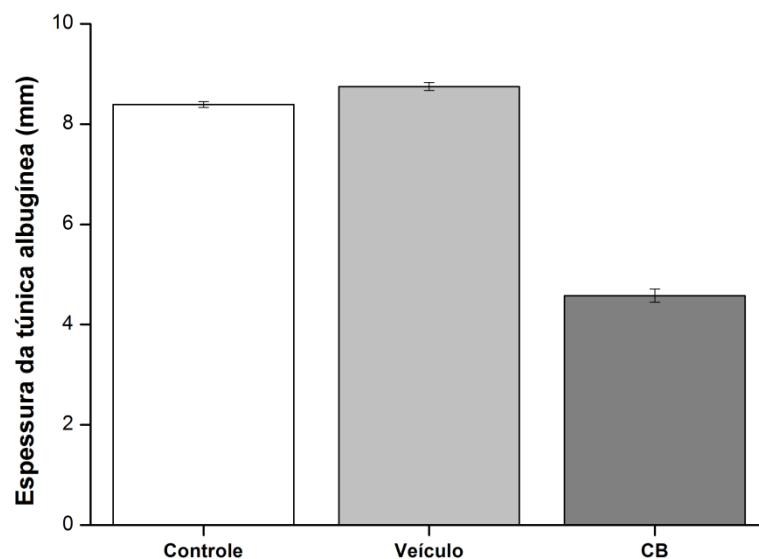


Fonte: Autor, 2020

#### 4.5 ESPESSURA DA TÚNICA ALBUGÍNEA

A espessura da túnica albugínea permaneceu inalterada no grupo veículo ( $P = 0,008$ ), e apresentou sua menor espessura no grupo CB, após 6 meses de implante ( $P = 0.001$ ).

Figura 8 – Espessura da túnica albugínea entre os grupos controle; veículo: salina e gel de celulose bacteriana (CB) após 6 meses de implante.

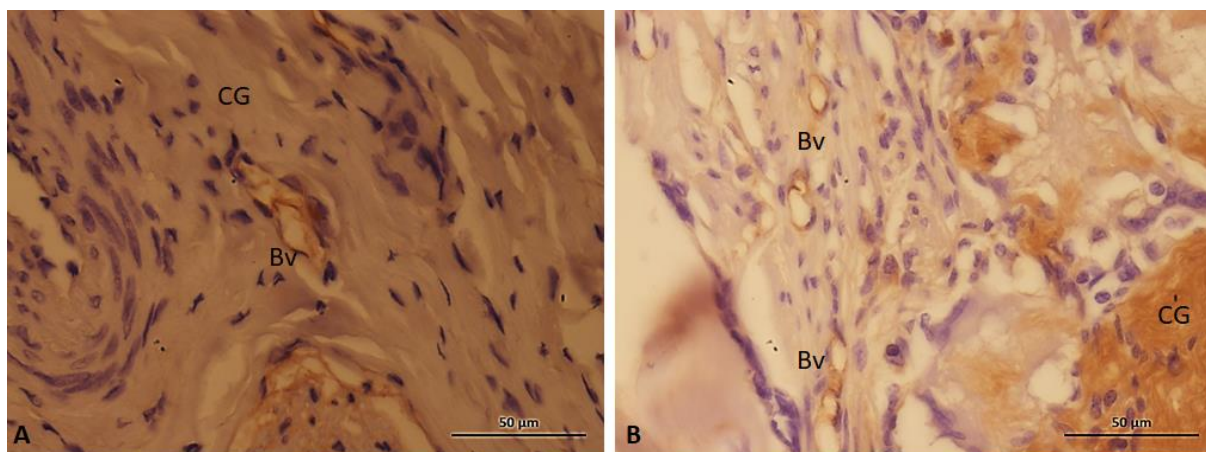


Fonte: Autor, 2020

#### 4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA NEOVASCULARIZAÇÃO DO IMPLANTE

Foi observado a vascularização do implante em ambos os tempos experimentais com uma maior vascularização no grupo CB 3 meses ( $P = 0.042$ ), com uma organização de vasos mais periféricamente localizados em relação ao implante (Figura 9).

Figura 9 – Imunohistoquímica de cortes transversais do corpo cavernoso preenchido com CB e corados com Anti-CD31 para células endoteliais após 3 e 6 meses de implante, respectivamente A e B.



Fonte: Autor, 2020

## 5 DISCUSSÃO

A disfunção sexual masculina é um distúrbio que afeta homens em diferentes faixas etárias e levam a alterações que podem interferir no comportamento psicológico levando a transtornos que afetam a vida conjugal com consequências imprevisíveis.

Ayta et al., em 1995, fizeram uma projeção da prevalência da DE para homens cinquentenários de 332 milhões em 2025<sup>76</sup>. A incidência varia muito com faixa etária, Shamloul et al., em 2013, relatam que a prevalência da DE é de 1 a 10% em homens com menos de 40 anos, varia de 2% a 9% em homens entre 40 e 49 anos, aumenta para 20-40% em homens com idade entre 60 e 69 anos. Em homens com mais de 70 anos, a prevalência de DE varia de 50% a 100%<sup>77</sup>.

Na maioria dos pacientes, a DE está relacionada às alterações no fluxo sanguíneo para o pênis. A função erétil por sua vez, depende do equilíbrio e integração entre fatores fisiológicos, estrutura tecidual, propriedades fibroelásticas dos corpos cavernosos, além do bom funcionamento de neurotransmissores, fatores vasoativos e endócrinos<sup>78</sup>. Logo, a deficiência de androgênios, através de orquiectomia ou tratamentos hormonais pode resultar em anormalidades estruturais do pênis, com perda de libido e declínio da função erétil<sup>79</sup>. Em 2005, Traish e colaboradores, demonstraram que a orquiectomia em coelhos resultou em perda da função erétil e atrofia peniana, associada à redução da musculatura lisa trabecular e aumento do conteúdo do tecido conjuntivo<sup>80</sup>.

Em relação à DE, nos últimos anos, houve um progresso significativo na compreensão dos mecanismos multifatoriais que modulam a capacidade erétil e predispõem à DE, levando à maior disponibilidade de opções de tratamento<sup>11,13-15,81</sup>, especialmente através de estudos com modelos animais, como ratos e coelhos<sup>82,83</sup>. No nosso estudo, coelhos da raça Nova Zelândia foram utilizados para se investigar os efeitos da orquiectomia e do tratamento subsequente com gel de celulose bacteriana (CB) na função erétil, incluindo a estrutura e função do tecido do corpo cavernoso. A escolha deste modelo teve como base o porte do animal, o fato de ser o modelo mais utilizado para avaliação experimental de implantes e a facilidade de acompanhamento da evolução clínica<sup>84</sup>.

O CB é obtido a partir do melaço da cana-de-açúcar, sendo um polímero estável e não absorvido pelos tecidos circundantes<sup>59,85</sup>. Pinto et al., em 2016,

avaliaram *in vitro* o gel de celulose bacteriana e observaram que não foi citotóxico, genotóxico ou agudamente tóxico e, ainda, atenuou os efeitos genotóxicos e mielotóxicos induzidos por ciclofosfamida, sugerindo ser um biomaterial seguro e promissor nas áreas da medicina e biologia<sup>86</sup>. Em 2012, pesquisadores do nosso grupo aplicaram o CB para preenchimento da orbita de coelhos eviscerados. Nesse estudo não foi observado infecção, intoxicação ou extrusão no CB, mostrando um bom efeito cosmético e de biocompatibilidade. Também sobre o uso injetável do biopolímero, pesquisadores do mesmo grupo compararam o uso do Copolímero de Dextranômero/ácido hialurônico (Dx/HA) com o CB em relação a sua biocompatibilidade na bexiga de coelhos, e, analisando amostras de 3 e 11 meses encontrou uma diferença significativa em favor do gel, especialmente em relação à preservação do material no local do implante, bem como a presença de neovascularização<sup>32</sup>. Esses resultados corroboram o presente estudo, onde também foi visível o efeito do preenchimento anatômico do corpo cavernoso (efeito *bulking*) com permanência do material *in situ*, ausência de reações inflamatórias. Essas características são ideais para o desenvolvimento de uma possível prótese peniana injetável.

O objetivo principal de uma prótese peniana é aumentar o volume peniano tanto em comprimento como em espessura que permita a atividade sexual, com consequente afilamento da túnica albugínea<sup>84</sup>. Na tabela 1 e na figura 4 é visível o aumento tanto do diâmetro ( $13.95 \pm 0.38$  para  $23.19 \pm 1.35$ ) quanto do comprimento peniano ( $41.04 \pm 1.61$  para  $49.96 \pm 0.68$ ), após as injeções com CB, assim como da diminuição da túnica albugínea. Esse aumento se manteve ao longo do tempo experimental (6 meses), sem perdas de volume. Por outro lado, não foram observadas alterações estatísticas entre no grupo veículo, pois devido à castração cirúrgica houve atrofia do corpo cavernoso e da túnica albugínea quando comparado com o grupo controle.

A análise histológica pela coloração de Hematoxilina-eosina também revelou o preenchimento do corpo cavernoso pelo CB com preservação dos constituintes teciduais. O CB permanece após os períodos de 3 e 6 meses, como demonstrado na figura 3 acarretando efeito de massa e sendo incorporado ao tecido, permeado por infiltrado inflamatório predominantemente linfomononuclear, células gigantes

multinucleadas do tipo corpo estranho, fibroblastos e vasos sanguíneos, demonstrado na tabela 3.

O CB é um material que desencadeia uma reação de corpo estranho, gerando uma resposta inflamatória cujo agente celular central é o macrófago que assume seu estado de ativação epitelióide e progressivamente se funde formando uma população de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho bastante numerosa nos nossos espécimes. Houve uma manutenção das células gigantes multinucleadas, que já se formaram no período de 3 meses e persistiram no tecido envolvendo o material exógeno incorporado. É possível que a permanência do corpo estranho funcione como estímulo para atrair mais macrófagos justificando o aumento numérico em 6 meses. A inflamação é fundamentalmente uma reação protetora e seu objetivo final é proteger o organismo de algo que esteja causando lesão celular. A reação inflamatória é um processo esperado com a injeção de qualquer material exógeno no organismo<sup>87</sup>.

Em paralelo à resposta celular ao CB estimula a neovascularização, como já foi demonstrado em experimentos anteriores, que em conjunto com o envolvimento do CB pelos elementos inflamatórios, garantem a incorporação do material exógeno ao tecido do hospedeiro. Na evolução de um processo inflamatório crônico também é usual que este tecido ricamente vascularizado seja progressivamente, pelo menos em parte, substituído por tecido fibroso, persistindo predominantemente vasos mais calibrosos que garantem a nutrição e, mais uma vez, é um fator pertinente na manutenção do material incorporado ao tecido<sup>87</sup>. Assim, no presente estudo, o achado de redução dos vasos sanguíneos no grupo de 6 meses comparado com o de 3 meses, poderia ser explicada, como já mencionado, pela organização do processo inflamatório, no qual pequenos vasos neoformados são substituídos por tecido conjuntivo.

Quanto à predominância de vascularização na periferia do implante, é algo esperado e justificável, já que a neovascularização em grande medida ocorre a partir de vasos preexistentes que estão na periferia, já que a região central está ocupada pelo implante. Outra possibilidade no grupo de 6 meses, é que houve uma diminuição no número de vasos, porém esses vasos eram mais calibrosos mostrando a sua boa integração tecidual. Estudo prévio, utilizando mesmo modelo animal, substituiu olhos eviscerados por CB, encontrou a presença de neovascularização, porém mesmo após

8 meses do seu experimento não foi encontrado neovascularização no centro do implante<sup>64</sup>, provavelmente pelo tempo de análise, assim como aconteceu em nosso experimento.

Em relação às fibras elásticas, podemos considerar o aparecimento de elastina como parte da deposição de matriz extracelular que ocorre na organização do processo e vai substituindo, pelo menos em parte, o tecido ricamente vascularizado. São as fibras elásticas que garantem elasticidade a um tecido<sup>87</sup>, ou seja, sua capacidade de se expandir e retrair, algo essencial no corpo cavernoso. Assim, o aumento delas, aos 6 meses, pode sinalizar uma maior capacidade de expansão, mesmo na presença do CB.

A injeção intracavernosa de CB apresenta-se como uma opção de terapia segura para DE em coelhos. O CB aumentou o diâmetro e o comprimento peniano, diminuiu a espessura da túnica albugínea, além de ser biocompatível, funcionando como uma opção de tratamento ambulatorial bem tolerado, clinicamente durável, minimamente invasiva e de baixo custo.

## **6 CONCLUSÃO**

O Gel de celulose bacteriana (CB) utilizado para preenchimento dos corpos cavernosos de coelhos para tratamento da disfunção erétil (DE), para uma possível prótese peniana, mostrou-se satisfatório com boa integração local, com aparecimento de neovascularização e mantendo-se estável no local, no período analisado, de 3 e 6 meses. Após novos estudos e com prazo mais longo de análise, isto poderá se transformar numa nova modalidade de tratamento para DE, podendo ser realizado com anestesia local em regime ambulatorial e com baixo custo.

## REFERÊNCIAS

1. NIH. Consensus Development Panel on Impotence. *Journal of the American Medical Association*, v.270, n.1, p.83-90, 1993.
2. BURNETT, A. L. et al. Erectile Dysfunction: AUA Guideline. *The Journal of Urology*, v.200, n.3, p.633-641, 2018.
3. BELLA, A. J. et al. CUA Practice guidelines for erectile dysfunction. *Canadian Urological Association Journal*, v.9, n.1-2, p.23-29, 2015.
4. FELDMAN, H. A. et al. Impotence and its medical and psychosocial correlates: Results of the Massachusetts male aging study. *Journal Urology*, v.151, n.1, p. 54-61, 1994.
5. RYU, J. K.; SUH, J.K.; BURNETT, A. L. Research in pharmacotherapy for erectile dysfunction. *Transl Androl Urology*, v.6, n.2, p.207-215, 2017.
6. GOLDSTEIN, I. et al. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group. *N Engl Me*, v.338, n.1, p.1397-1404. 1998.
7. LEE, M. Focus on Phosphodiesterase Inhibitors for the Treatment of Erectile Dysfunction in Older Men. *Clinical Therapeutics*, v.33, n.11, p.1590-1608, 2011.
8. MONTAGUE, D. K. et al. The management of erectile dysfunction: an AUA updt. *Journal Urology*, v.174, n.1, p.230-239, 2005.
9. LATINI, D.M. et al. Longitudinal differences in disease specific quality of life in men with erectile dysfunction: results from the Exploratory Comprehensive Evaluation of Erectile Dysfunction study. *Journal Urology*, v.169, n.4, p.1437-1442, 2003.
10. COSTABILE, R. A. Optimizing treatment for diabetes mellitus induced erectile dysfunction. *Journal Urology*, v.170, n.2, p.S35-S38, 2003.
11. De BERARDIS, G. et al. Identifying patients with type 2 diabetes with a higher likelihood of erectile dysfunction: the role of the interaction between clinical and psychological factors. *Journal Urology*, v.169, n.4, p.1422-1448, 2003.
12. ROMEO, J. H. et al. Sexual function in men with diabetes type 2: association with glycemic control. *Journal Urology*, v.163, n.3, p.788-7891, 2000.
13. BURCHARDT, M. et al. Hypertension is associated with severe erectile dysfunction. *Journal Urology*, v.164, n.4, p.1188-1191, 2000.
14. GOLDSTEIN, I. The mutually reinforcing triad of depressive symptoms, cardiovascular disease, and erectile dysfunction. *American Journal Cardiology*, v.86, n.2A, p.41F-45F, 2000.

15. KAWANISHI, Y. et al. Screening of ischemic heart disease with cavernous artery blood flow in erectile dysfunctional patients. *Int J Impot Res*, v.13, n.2, p.100-103, 2001.
16. KLONER, R. A. et al. Erectile dysfunction in the cardiac patient: how common and should we treat? *Journal Urology*, v.170, n.2, S46-S50, 2003.
17. VALICENTI, R. K. et al. Longitudinal comparison of sexual function after 3-dimensional conformal radiation therapy or prostate brachytherapy. *Journal Urology*, v.168, n.6, p.2499-2504, 2002.
18. CAMPBELL, J. D. et al. What Is the Future of Erectile Dysfunction Therapy?. *Current Sexual Health Reports*, v. 10, n. 3, p. 169-176, 2018.
19. KRZASTEK, S. C. et al. Recent advances in the understanding and management of erectile dysfunction. *F1000Res*, v.8, n.1, p.1-8, 2019.
20. BETTOCCHI, C. et al. Penile Prosthesis: What Should We Do about Complications? *Advances in Urology*, v.573560, 2008.
21. MONTORSI, F. et al. Penile implants in the era of oral drug treatment for erectile dysfunction. *BJU Int*, v.94, n.5, p.745-751. 2004.
22. SADEGHI-NEJAD, H. Penile prosthesis surgery: a review of prosthetic devices and associated complications. *Sexual Medicine Reviews*, v.4, n.1, p. 296-309. 2007.
23. MAHON, J. et al. Infectious Adverse Events Following the Placement of a Penile Prosthesis: a systematic review. *Sexual Medicine Reviews*, v.8, n.2, p.348-354, 2019.
24. BERGER, A. et al. Impact of Index Surgical Care Setting on Perioperative Outcomes and Cost following Penile Prosthesis Surgery. *Sexual Medicine Reviews*, v.16, n.9, p.1451-1458, 2019.
25. OLIVEIRA, J. A. A. et al. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v.69, n.5, p.138-155, 2003.
26. CASTRO, C. M. M. B. et al. Citotoxicidade do biopolímero de cana-de-açúcar. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*, v.49, n.2, p.119-123, 2004.
27. VILAR, F. O. et al. Utilização do biopolímero de cana-de-açúcar na túnica albugínea: estudo experimental em cães. In: 30º Congresso Brasileiro de Urologia, 2005, Brasília. *Annals International Brazilian Journal Urology*, v. 30, n.1, p. 126-126, 2005.

28. CHAGAS, H. M, et al. Uso da membrana de biopolímero de cana de açúcar em reconstrução uretral. *International Brazil Journal Urology*, v. 30, n.1, p. 43-46, 2005.
29. LIMA, F. R. et al. Resposta inflamatória á membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno® implantadas no peritônio parietal de ratos. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*, v.50, n.1, p. 37-40, 2005.
30. LUCENA, R. G. et al. Um novo material para o tratamento da incontinência urinária: estudo experimental. In: Brasília. *International Brazil Journal Urology*, Rio de Janeiro, v. 30. n. 1, p.105-105, 2005.
31. GONÇALVES, R. et al. Bio-Sling no tratamento da incontinência urinária de esforço: estudo experimental e primeiros ensaios clínicos. *Annals International Brazilian Journal of Urology*, Rio de Janeiro, v.32, suppl. 2, p. 41-42, 2006.
32. LIMA, S. V. C. et al. The biocompatibility of a cellulose exopolysaccharide implant in the rabbit bladder when compared with dextranomer microspheres plus hyaluronic acid. *Urology*, v.85, n. 6, p.1-5, 2015.
33. ELÍSIO JÚNIOR, R. C. et al. Prevention of peritoneal adhesion using a bacterial cellulose hydrogel, in experimental study. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.30, n.3, p. 194-198, 2015.
34. ANDERSSON, K. E. Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. *Journal Urology*. v.170, n.2, p.S6-S13, 2003.
35. ANDERSSON, K. E.; WAGNER, G. The physiology of penile erection. *Physiol Rev*. v.75, n.2, p.191-236, 1995.
36. LUE, T.; DAHIYA, M. Molecular biology of erectile function and dysfunction. *Mol Urology*, v.1, n.1, p.35-48, 1997.
37. UDELSON, D. et al. Engineering analysis of penile hemodynamic and structural dynamic relationships Part I - Clinical implications of penile tissue mechanical properties. *Int J Impot Res*, v. 10, n.1, p.15-24, 1998.
38. MARSHALL, J. S.; HAOCHENG, L.; RUN, W. New advances in erectile technology. *Ther Adv Urology*, v.6, n.1, p.15-24, 2014.
39. MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*. v.100, n.9, p.2146-2152, 1997.
40. CHEN, J. et al. Effect of oral administration of high-dose nitric oxide donor L-arginine in men with organic erectile dysfunction: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *BJU Int*. 1999; v.83, n.3, p.269-273.
41. MORELAND, R. B. Is there a role for hypoxemia in penile fibrosis? *Int J Impot Res*. v. 10, n.1, p.113-120, 1998.

42. BATTY, G. D. et al. Erectile dysfunction and later cardiovascular disease in men with type 2 diabetes, prospective cohort study based on de advance. *J Am Coll Cardiology*, v.56, n.23, p.1908-1913, 2010.
43. BURNETT, A. L. Environmental erectile dysfunction: can the environment really be hazardous to erectile health? *J Androl*, v. 29, n.3, p.229-236, 2009.
44. VIRAG, R.; BECK-ARDILLY, L. Nosology, epidemiology, clinical quantification of erectile dysfunctions. *Rev Med Intern*, v.18, n.1, p. S10-S13, 1997.
45. ERECTILE DYSFUNCTION EPIDEMIOLOGIC STUDY GROUP (TEDES). An epidemiological study of erectile dysfunction in Thailand (Part 1: Prevalence). *J Med Assoc Thai*, v. 83, p. 872-879, 2000.
46. RAJFER, J. et al. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *The New England Journal of Medicine*, v. 326, n.2, p. 90-94, 1992.
47. CARRION, H. et al. A History of the Penile Implant to 1974. *Sex Med Rev*. 2016 Jul; 4(3): 285-293.
48. BOGORAS, N. Über die volle plastische Wiederherstellung eines zum Koitus fähigen Penis (Penioplastica totalis). *Zentra*, v.63, n.1, p.271-275,1936.
49. BERGMAN, R. T. et al. Plastic reconstruction of the penis. *Journal Urology*, v.59, n.1, p.174, 1948.
50. BEHERI, G. E. Surgical Treatment of impotence. *Plast Reconstr Surg*, v. 38, n.2, p.92-97, 1966.
51. LASH, H.; ZIMMERMAN, D. C.; LOEFFLER, R. A. Silicone implantation: Inlay method. *Plast Reconstr Surg*, v.34, n1, p.75-78, 1964.
52. PEARMAN, R. O. Treatment of organic impotence by implantation of a penile prosthesis. *Journal of Urology*, v.97, n.4, p. 716-9, 1967.
53. GEROW, F. J.; SPIRA, M.; HARDY, S. B. Plastic surgery applications of synthetic implants. *Med Instrum*, v.7, n.2, p. 96-99, 1973.
54. SMALL, M. P.; CARRION, H. M.; GORDON, J. A. Small-carrion penile prosthesis: New implant for management of impotence. *Urology*, v.5, n.4, p. 479-486, 1975.
55. SMALL, M. P. Small-carrion penile prosthesis: A report on 160 cases and review of the literature. *Journal Urology*, v.119, n.1, p.365-368, 1978.
56. SCOTT, F. B.; BRADLEY, W. E.; TIMM, G. W. Management of erectile impotence: Use of implantable inflatable prosthesis. *Urology*, v.2, n.1, p.80-82, 1973.

57. PATERSON-BEEDLE, M. et al. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydrate Polymers*, v.42, n.1, p.375-383, 2000.
58. COELHO, M. C. O. C. et al. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para a cicatrização cutânea. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.17, p.11-13, 2001.
59. MELO, F. A. D. *Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeo extracelular por Zoogloea sp em melaço de cana-de-açúcar*. 2003 100f. (Tese Doutorado). Centro de Tecnologia e Geociências. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
60. VILAR, F. O, et al. A wet dressing for male genital surgery: A phase II clinical trial. *International Brazilian Journal Urology*, v.42, n.6, p.1220-1227, 2016.
61. WILLIAMS, D. F. author. Definition in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the european society for biomaterials. *Progress in biomedical engineering*. 4<sup>nd</sup> .ed. New York: Ed Elsevier; 1987.p.67-72.
62. ABREU, T. C. et al. The biopolymer sugarcane as filling material of critical defects in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2016.
63. COELHO JÚNIOR, E. R. C, et al. Prevention of peritoneal adhesion using a bacterial cellulose hydrogel, in experimental study. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.30, n.3, p. 194-198, 2015.
64. BARBOSA, F. A.C. et al. Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits. *Arquivos Brasileiro de Oftalmologia*, v.75, n.4, p. 267-272, 2012.
65. LUCENA, M. T. et al. Biocompatibility and cutaneous reactivity of cellulosic polysaccharide film in induced skin wounds in rats. *J Mater Sci: Mater Med*, v.26, n.2, p.82-86, 2015.
66. AGUIAR, J. L. A. et al. Membrana de biopolímero de cana-de-açúcar como remendo em arterioplastias femorais de cães. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.22, n.1, p. 77-81, 2007.
67. MAYER, D. L. B. et al. Membrana do biopolímero da cana-de-açúcar: avaliação experimental na orelha média. *Brazilian Journal Otorhinolaryngol*, v.77, n.1, p.44-50, 2011.
68. MEDEIROS JÚNIOR, D. M. et al. Hydrogel of polysaccharide of sugarcane molasses as carrier of bone morphogenetic protein in the reconstruction of critical bone defects in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.28, n.4, p.233-238, 2013.
69. MARTINS, A. G. S. et al. A wet dressing for hypospadias surgery. *Int Braz J Urol*, v.39, n.3, p.408-413, 2013.

70. TAVARES L. H. M. et al. Biopolymer sponge for high grade renal trauma: an experimental study in rabbits. *Open Journal of Urology*, v.4, n.1, p.1-6, 2014.
71. LIMA, S. V. C. et al. A new material to prevent urethral damage after implantation of artificial devices: an experimental study. *Int Braz Journal Urology*, v.43, n. 2, p.335-344, 2017.
72. NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. *The anatomy of the domestic animals*. 1<sup>a</sup> ed. Hamburg: Editora Verlag Paul Parey; 1979. p.78.
73. HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. Rio de Janeiro: Manole 2004, p. 277.
74. SWENSON, M. J. Dukes: *Fisiología dos Animais Domésticos*. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996, p. 57.
75. ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J: *Histologia texto e atlas*. São Paulo, Editora Médica Panamericana. 1993; p. 34.
76. AYTA, I. A.; MCKINLAY, J. B.; KRANE, R. J. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int*, 84, n.1, p. 50-56, 1999.
77. SHAMLOUL, R.; GHANEM, H. Erectile dysfunction. *The Lancet*, v.381, n.9861, p.153-165, 2013.
78. DEAN, R. C.; Lue, T. F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am*, v.32, n.4, p. 379-382, 2005.
79. MULLIGAN, T. et al. Prevalence of hypogonadism in males aged at least 45 years: the HIM study. *Int J Clin Pract*, 2006;60(7):762-9.
80. ABDULMAGED, M. et al. Adipocyte Accumulation in Penile Corpus Cavernosum of the Orchiectomized Rabbit: A Potential Mechanism for Venous-occlusive Dysfunction in Androgen Deficiency. *Journal of Andrology*, v.26, n.2, p.242-248, 2005.
81. COSTABILE, R. A. Optimizing treatment for diabetes mellitus induced erectile dysfunction. *J Urol*, v.170, n.2, p.S35-8, 2003.
82. PALESE, M. A.; CRONE, J. K.; BURNETT, A. L. A. Castrated mouse model of erectile dysfunction. *Journal of Andrology*, v.24, n.5, p.699-703, 2003.
83. MULHALL, J. P. et al. Sildenafil citrate improves erectile function after castration in a rat model. *BJU International*, v.113, n.4, p.656-661, 2014.
84. MULCAHY, J. J.; WILSON, S. K. Current use of penile implants in erectile dysfunction. *Curr Urol Rep*, v.7, n.6, p.485-489, 2006.
85. PITA, P. C. C. et al. Biocompatibility of the bacterial cellulose hydrogel in subcutaneous tissue of rabbits. *Acta Cir Bras*, v.30, n.4, p.296-300, 2015.

86. PINTO, F. C. et al. Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. *Carbohydr Polym*, v.10, n.137, p.556-560, 2016.
87. COLLINS, T. Inflamação aguda e crítica. In: ROBBINS, S. L. et al., autores. *Patologia estrutural e funcional*. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 44-78.