OSKAR GRAU KAUFMANN

Avaliação da função erétil após a reconstituição do
nervo cavernoso com o uso de células tronco de medula-
óssea : estudo experimental em ratos

Tese apresentada a Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Urologia

Orientador : Prof. Dr. Miguel Srougi

Co-orientador: Dr. Mario Paranhos

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Kaufmann, Oskar Grau

Avaliação da função erétil após a reconstituição do nervo cavernoso com o uso de células-tronco de medula-óssea : estudo experimental em ratos / Oskar Grau Kaufmann. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Urologia.

Orientador: Miguel Srougi.

Co-orientador: Mario Paranhos.

Descritores: 1.Disfunção erétil 2.Nervos periféricos 3.Células-tronco adultas
4.Epidemiologia experimental 5.Ratos Wistar

USP/FM/SBD-321/08

**Não é pelo meu próprio mérito, mas
pelo mérito dos meus pais,
pelo mérito dos meus avós,
assim como,
pelo mérito de todos aqueles
que vieram antes de mim.**

**A minha família,
Meus pais e minha irmã,
pelo amor incondicional
e por todo apoio que sempre tive.**

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Miguel Srougi**, pessoa irrepreensível, de caráter e amizade, por ter sido não somente o orientador da minha tese de doutorado, mas por ter me orientado desde o início da minha vida urológica, ainda na residência médica. Sempre me incentivando, me estimulando e proporcionando assim o mais alto grau de desenvolvimento acadêmico e científico que um professor pode oferecer aos seus alunos.

Ao **Prof. Dr. Homero Bruschini** pela oportunidade na pós-graduação, acreditando sempre que esse momento seria possível através de seu apoio e de suas reflexões que mudaram definitivamente os caminhos da minha carreira.

Ao **Prof. Dr. Jose Cury** pelos ensinamentos diários e por ser talvez o maior e com certeza, o primeiro responsável por despertar a minha paixão inicial pela urologia desde os tempos da saudosa Liga Urológica Acadêmica – LUA da Escola Paulista de Medicina.

Ao **Prof. Dr. Joaquim Franciso de Almeida Claro** meu grande mestre, que com muito carinho, sempre esteve preocupado em que não trilhasse os caminhos obscuros da minha vida, não só acadêmica e que nunca se esquece, mesmo nas mais adversas situações, do seus discípulos.

Ao **Prof. Dr. Mario Paranhos**, pessoa com quem os laços de amizade vem se tornando cada vez mais fortes com o passar do tempo e que sempre esteve a disposição para me ajudar a transpor os momentos mais difíceis dessa jornada.

Ao **Prof. Dr. Luiz Eugênio Araujo Moraes Mello** com quem logo no primeiro ano do curso médico tive o prazer de trabalhar e aprender minhas primeiras lições no exercício da minha vida acadêmica. Lições essas que foram fundamentais para a criação de minha base científica e que depois de muitos anos, me abriu novamente as portas, a fim de que uma nova fase pudesse se iniciar.

À **Profa. Dra. Beatriz Longo**, por toda ajuda possível e não imaginável, por estar a disposição, pela oportunidade de compartilhar seu conhecimento e me incentivar, além de acreditar sempre em nossos ideais.

Ao **Prof. Dr. Wilson Ferreira Aguiar**, no início só mais um veterano, que se tornou meu chefe e hoje meu grande amigo. Ele mesmo sabe que sem sua ajuda, com certeza, nada disso teria possível.

Ao **Prof. Dr. Enrico Andrade**, brilhante cientista que sempre me acolheu e me orientou da melhor forma possível não só na realização deste trabalho mas por suas sugestões valiosas.

A Sra. **Elisa de Arruda Cruz**, a quem sempre recorri e corri em busca de ajuda, fatores sem os quais, com a absoluta certeza, esse trabalho seria infinitamente mais árduo.

A Sra. **Adriana Sañudo**, muito obrigado pela ajuda na elaboração dos dados e confecção estatística da amostra do nosso trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências : adaptado de *International Comittee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo : Serviço de Biblioteca e Documentação;2005.

Sumário

Listas de Figuras

Listas de Gráficos

Listas de Tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução	1
2. Objetivos	11
3. Métodos.....	13
4. Resultados	27
5. Discussão.....	31
6. Conclusões	38
7. Anexos.....	40
8. Referências	44

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho anatômico do nervo cavernoso.....	16
Figura 2 - Foto-desenho do nervo cavernoso e sua localização.	17
Figura 3 - Nervo cavernoso após dissecção periprostática e abertura da fáscia endopélvica respectivamente.	18
Figura 4 - Nervo cavernoso (A) e Colocação pontos reparo (B).	19
Figuras 5 - Fixação da sonda guia junto às extremidades do segmento do nervo cavernoso ressecado (A) e fechamento com uso de cola (B).	20
Figura 6 - Injeção das soluções contendo material salino ou células tronco de medula óssea.	21
Figura 7 - Ereção peniana após teste com apomorfina.	26

LISTAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência de animais com ereções induzidas nos diferentes grupos experimentais	30
--	----

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de animais com ereções induzidas nos diferentes grupos experimentais	29
---	----

Resumo

Kaufmann OG. *Avaliação da função erétil após a reconstituição do nervo cavernoso com o uso de células-tronco de medula-óssea: estudo experimental em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 50p.

Introdução: Atualmente a prostatectomia radical retropúbica tem sido responsável por grande parte dos casos de disfunção erétil de causa neurogênica. O desenvolvimento de técnicas como a cirurgia com preservação do feixe vâsculo-nervoso, eletro-estimulação intra-operatória o uso de enxertos autólogos para se reestabelecer a comunicação dos nervos cavernosos têm minimizado o grau de lesão neuronal. Entretanto, faz-se necessária a criação de novos métodos de restauração do nervo cavernoso. Neste estudo, investigaremos o uso e a aplicação de células tronco adultas de medula óssea de ratos e sua capacidade para regeneração do nervo cavernosos lesado e para restauração da função erétil em ratos. **Objetivo:** Avaliar a influência de células tronco adultas da medula óssea de ratos na regeneração do nervo cavernosos lesado, tomando-se como parâmetro o retorno da função erétil nos animais submetidos ao teste de ereção induzido pela apomorfina. **Material e Método:** Quarenta e oito ratos Wistar-EPM machos, com idades entre 9 e 10 semanas, pesando aproximadamente 250 gramas foram usados e randomicamente subdivididos em quatro grupos de estudo contendo 12 animais cada. Os grupos experimentais foram divididos em: Grupo I: exposição cirúrgica bilateral nervo cavernoso sem lesão do mesmo. Grupo II: lesão cirúrgica bilateral do nervo cavernoso de aproximadamente 3 mm, sem reconstrução. Grupo III: lesão cirúrgica bilateral dos nervos cavernosos de aproximadamente 3 mm, e reconstrução bilateral com sondas guias de silicone contendo solução salina em seu interior. Grupo IV: lesão cirúrgica bilateral dos nervos cavernosos de aproximadamente 3 mm, e reconstrução bilateral com sondas guias de silicone semeadas com células-tronco adultas em seu interior. Quatro semanas após a cirurgia, os animais foram injetados com apomorfina para indução da ereção. **Resultados:** No grupo I observou-se resposta erétil completa em todos os animais (100% - 12 em 12). Por outro lado nenhum dos animais do grupo II apresentou ereções após a administração de apomorfina. Cinco dos doze animais do grupo III (41,7%) apresentaram ereções enquanto que nove dos 12 animais do grupo IV (75%) evidenciaram ereções após o estímulo. Quando foram comparadas as frequências de restauro de ereção nos quatro grupos,

demonstrou-se que grupo IV teve um comportamento semelhante ao grupo I ($p = 0,217$), ao passo que os animais do grupo III apresentaram frequência de ereções inferiores aos do grupo I ($p = 0,005$). Por outro lado, a comparação dos resultados entre os grupo III e IV versus o grupo II, demonstrou que a frequência de ereções foi estatisticamente superior nos dois primeiros grupos ($p = 0,037$ e $p < 0,001$, respectivamente). Finalmente, o grupo IV apresentou tendência a maior número de ereções quando comparado ao grupo III (75% versus 41,7%) mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,098$). **Conclusão:** O presente estudo demonstra que células tronco adultas da medula óssea, semeadas em sondas guias de silicone, favorecem a regeneração dos nervos cavernosos e promovem o reestabelecimento da função erétil em um modelo animal.

Descritores: 1.Disfunção erétil 2.Nervos periféricos 3.Células tronco adultas 4.Epidemiologia experimental 5.Ratos Wistar

Summary

Kaufmann OG. *Cavernous nerve reconstitution with the use of bone marrow stem cells and erectile function evaluation: an animal experimental study* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 50p.

Objective: To assess the influence of adult stem cells from bone marrow of rats in the regeneration of cavernous nerve, taking as a parameter the return of erectile function in animals subjected to the test of erection induced by apomorphine. **Methods:** Forty-eight WISTAR-EPM male rats, aged between 9 and 10 weeks, weighing approximately 250 grams were used and randomly divided into four groups of study containing 12 animals each. The experimental groups were divided into: Group I: surgical exposure of bilateral cavernous nerves without injury. Grupo II: surgical bilateral lesion of cavernous nerve with approximately 3 mm, without reconstruction. Group III: surgical bilateral lesion of cavernous nerves of approximately 3 mm, and bilateral reconstruction with silicone tube containing saline solution inside. Group IV: surgical bilateral lesion of cavernous nerves of approximately 3 mm, and bilateral reconstruction with silicone tube containing adult stem-cells inside. Four weeks after surgery, the animals were injected with apomorphine for induction of erection. **Results:** In Group I there was complete erectile response in all animals (100% - 12 in 12). On the other hand none of the animals in Group II presented erection after the use of apomorphine. Five of the twelve animals of group III (41.7%) had erections while nine of the 12 animals of Group IV (75%) showed them after the stimulus. When we compared the frequency of restoration of erection in the four groups, it was shown that group IV had similar performance to the group I ($p = 0,217$), while the animals in Group III had a frequency of erections inferiors to the Group I ($P = 0,005$). Moreover, comparison of results between the group III and IV versus the group II, showed that the frequency of erections was statistically higher in the first two groups ($p = 0,037$ $p < 0,001$, respectively). Finally, the group IV presented trend the largest number of erections when compared to Group III (75% versus 41.7%) but this difference was not statistically significant ($p = 0,098$). **Conclusion :** This study shows that adult stem cells from bone marrow, sown in probes silicone guides, promote the regeneration of cavernous nerves and restore erectile function in an animal model.

Descriptors: 1.Erectile dysfunction 2.Peripheral nerves 3.Adult stem cells 4.Epidemiology, experimental 5.Rats, Wistar

1. Introdução

O câncer de próstata é a neoplasia não cutânea mais comum nos homens, com aproximadamente 186.300 novos casos esperados para 2008, nos Estados Unidos¹. Atualmente, a prostatectomia radical retropúbica, indicada para o tratamento de neoplasias localizadas de próstata, é aceita como forma curativa de tratamento. Esta técnica, porém, tem sido responsável por grande parte dos casos de disfunção erétil de causa neurogênica. Tração, compressão e laceração têm sido os principais mecanismos de lesão dos nervos periféricos durante a prostatectomia radical, levando a degeneração dos mesmos². A regeneração neuronal se inicia pelo coto proximal poucas horas após a lesão, mas fatores como tempo e a extensão do defeito criado são fundamentais para uma reinervação adequada³.

O desenvolvimento de técnicas como a cirurgia com preservação do feixe vâsculo-nervoso⁴, eletro-estimulação intra-operatória⁵ e o uso de enxertos autólogos para se reestabelecer a comunicação dos nervos cavernosos⁶ têm minimizado o grau de lesão neuronal.

Entretanto, faz-se necessária a criação de novos métodos de restauração do nervo cavernoso, uma vez que as indicações atuais

para o uso apropriado de enxertos neurais autólogos ainda estão sendo definidas ⁷.

Novas estratégias para se promover a recuperação desses nervos periféricos lesados durante o procedimento cirúrgico têm sido descritas. Desde o uso de enxertos autólogos até diversas técnicas experimentais como o emprego de células de Schwann, fatores neurotróficos e polipetídeos que regulam a sobrevivência e regeneração neuronal, têm sido tentados ^{8,9}. Alguns estudos têm se mostrado promissores com o uso de células tronco adultas para restauração de nervos periféricos em outros sítios anatômicos, como por exemplo, o nervo ciático de ratos ¹⁰.

Um dos métodos tradicionais para se substituir uma parte de um nervo danificado é pelo transplante de outro segmento neuronal em seu lugar. O conceito de transplante autólogo de nervo está bem definido e tem sido aplicado por décadas para tratar lesões de nervos periféricos, nervo facial e extremidades neurais, com uma excelente segurança e eficácia ¹¹⁻¹⁴. Existem, obviamente, diferenças inerentes no processo de reinervação das fibras somáticas do nervo ciático (um dos mais comumente estudados em modelos animais) e fibras autonômicas, como por exemplo, dos nervos cavernosos. No entanto, vários estudos prévios demonstraram regeneração de nervos autonômicos como os nervos frênico e parassimpáticos do coração ^{15,16}. O nervo enxertado funciona

como um molde que coordena a regeneração dos axônios no defeito criado junto ao nervo lesado. A taxa de regeneração neural é de cerca de 1 mm por dia, em adultos ¹⁶.

O nervo selecionado para enxerto deve ter comprimento adequado e sua ausência deve resultar em morbidade mínima no local doador. O nervo sural responsável pela sensibilidade da face anterolateral da perna é um dos doadores nervosos preferidos por causa da sua acessibilidade, alta densidade fascicular e mínima ramificação. O nervo sural tem sido usado como um enxerto para substituir vários tipos de nervos, incluindo os feixes cavernosos ressecados após a prostatectomia radical. No entanto, este procedimento resulta em perda da sensibilidade da face lateral do pé e aumenta o tempo cirúrgico e as perdas de sangue, podendo ainda resultar em neuromas dolorosos proximais no local ressecado. Assim sendo, o conceito de substituição do nervo cavernoso é considerado válido, desde que se possa melhorar a técnica de substituição do mesmo.

Reinervação após ressecção e enxerto do nervo cavernoso foi demonstrada pela primeira vez em um modelo animal por Quinlan ¹⁷ e Burgers ¹⁸. Ball et al descreveu uma técnica de reconstituição do nervo cavernoso utilizando tubos de silicone preenchidos com Matrigel (Becton, Dickinson e Company, Franklin Lakes, New Jersey) ou

fatores de crescimento de fibroblastos no modelo animal com resultados positivos^{19,20}.

May et al.⁸ representam um importante avanço no enxerto de nervo cavernoso. Eles sugerem que conduítes artificiais, com ou sem a ajuda das células de Schwann podem ser mais confiáveis do que os seus homólogos biológicos, tais como o nervo sural, quanto à regeneração.

Embora os estudos iniciais de enxerto nervoso em seres humanos não tenham demonstrado o sucesso dos trabalhos em animais²¹, o interesse neste tema foi renovado por Kim et al, que tem relatado casos de sucesso em uma série inicial de homens submetidos à prostatectomia radical retropúbica com enxerto de nervo sural^{22,23,24}.

Células primordiais da medula óssea contribuem para a revascularização e regeneração tecidual em diversas patologias isquêmicas. Tem sido demonstrado que a medula óssea constitui uma fonte rica em células-tronco e progenitoras que podem se mobilizar rapidamente para os sítios isquêmicos²⁵ e se infiltrar no parênquima, onde dão origem primariamente à micróglia ou células endoteliais²⁶ e a um pequeno número de células que expressam marcadores neuronais e de astrócitos²⁷.

Em 2001 foi demonstrado que essas células também podem proliferar e, sob determinadas condições, se diferenciar em vários

tipos celulares, incluindo osteoblastos, condrócitos, adipócitos, fibroblastos e células do músculo liso, indicando que esta é também uma célula-tronco²⁸. As populações isoladas de pericitos são heterogêneas quanto à sua morfologia e fisiologia. Além disso, estas células secretam várias moléculas vasoativas e componentes da membrana basal e da matriz extracelular²⁹. Até recentemente, acreditava-se que o destino final de uma célula adulta era restrito ao seu órgão de origem. Entretanto, é sabido agora que as células-tronco adultas podem assumir destinos diferentes²⁹.

Já está bem estabelecido na literatura que o sistema hematopoiético é uma excelente fonte de células para manipulação e transplante. Células de medula óssea são mais acessíveis e simples de manipular do que células-tronco neurais³⁰. A identificação recente de duas categorias de células-tronco adultas multipotentes na medula óssea, células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas, com capacidades distintas de diferenciação, confirmaram a importância dessa estrutura na terapia celular³¹.

As células-tronco adultas são células indiferenciadas, responsáveis pela geração de células especializadas durante os processos de crescimento, diferenciação tissular, renovação celular e reparo tecidual ao longo da vida. Assim como as embrionárias, as células-tronco

adultas possuem capacidade de auto-renovação e de diferenciação em tipos celulares especializados ao sofrer processo de divisão celular. Essa característica garante a manutenção de um estoque de células indiferenciadas capazes de perpetuar a capacidade de reparo ou renovação de um determinado tecido. A descoberta recente da plasticidade dessas células acendeu a esperança de tratamento para pacientes com as mais diversas patologias degenerativas e traumáticas para as quais ainda não se dispõe de terapias eficazes.

As células-tronco da medula óssea apresentam uma grande heterogeneidade podendo sofrer modificações fenotípicas, para formar precursores ou células-tronco com outras propriedades após interação com outros fatores presentes no sangue e nos tecidos ³¹. É provável que a medula óssea sirva normalmente como um reservatório de células-tronco para vários tecidos, que captam estas células circulantes através do leito vascular.

As células-tronco mesenquimais, encontradas no estroma de vários órgãos, representam a população melhor estudada. Estas células aderentes proliferam, formam colônias e são capazes de se diferenciar em vários tipos celulares, tais como osteoblastos, condroblastos e adipócitos, representando uma população celular bastante heterogênea ²⁸.

A facilidade com que as células mesenquimais podem ser obtidas a partir da medula óssea ou do tecido adiposo e expandidas *in vitro*, assim como as suas propriedades biológicas, fazem com que elas sejam excelentes agentes para utilização em terapias celulares. Ademais, as células mesenquimais têm propriedades imunossupressoras já bem demonstradas. A atividade inibidora da proliferação de linfócitos ativados por estimulação com antígeno, mitógeno e em reações mistas linfocitárias foi observada *in vitro* ^{33,34}. A rejeição de transplante de pele alogênico em babuínos também foi retardada após a administração de células mesenquimais de medula óssea ³⁵. Estas células podem, portanto, ter efeito terapêutico não apenas pela sua plasticidade, mas pela sua atividade moduladora de respostas imuno-inflamatórias. Esta atividade pode contribuir para efeitos imunossupressores observados em modelos animais ³⁶ e em pacientes ³⁵ após o tratamento com células de medula óssea. Em estudos *in vitro* foi demonstrado que as células mesenquimais da medula óssea não estimulam respostas alorreativas ^{33,34}. O fato das células mesenquimais serem, aparentemente, não-imunogênicas viabiliza a sua utilização alogênica em terapia celular. Além de serem facilmente expandidas em cultura, mantendo as suas características, essas células podem ainda ser manipuladas geneticamente para servirem como veículos de

terapia gênica em doenças genéticas, degenerativas e neoplásicas ^{37,38}. Em conjunto, as propriedades acima descritas estimularam vários grupos de pesquisa a desenvolver investigações visando à aplicação dessas células em terapias regenerativas.

As evidências de que as células-tronco adultas são capazes de reconhecer sinais de dano tecidual e migrar para áreas de lesão em vários órgãos e tecidos são crescentes. Em modelo de lesão glomerular em ratos, observou-se através de análise por ressonância nuclear magnética, que as células mesenquimais de medula óssea marcadas com partículas magnéticas migraram para as áreas lesadas do rim quando injetadas por via endovenosa. Em modelo de doença de Parkinson induzido por injeção de 6-hidroxidopamina em ratos, observou-se que células mesenquimais injetadas no hemisfério contralateral migram para as áreas de lesão do hemisfério oposto. Em modelos de cardiopatia, observou-se a migração de células-tronco de medula óssea para o coração ³⁶. A estimulação da produção tecidual de citocinas e quimiocinas por agentes inflamatórios ativa a migração e recrutamento de progenitores neurais em secções de hipocampo ³⁹.

A melhora funcional observada após a terapia com células-tronco adultas em diversas doenças degenerativas pode ser também ou, principalmente, devido à liberação de mediadores na área da lesão.

Células-tronco mesenquimais secretam uma variedade de mediadores, incluindo citocinas e fatores de crescimento⁴⁰. O efeito imunossupressor das células-tronco mesenquimais parece ser devido à liberação de mediadores solúveis³³. O efeito supressor também pode ser devido à indução de processos de apoptose nas células inflamatórias no sítio de lesão^{36,41}. Além do efeito supressor, as células-tronco promovem a degradação de tecido fibroso, estimulam a angiogênese e promovem a proliferação celular⁴⁰. O reparo tecidual pode, portanto, envolver o recrutamento de células-tronco residentes ou precursoras que migram da circulação para o tecido lesado, promovendo a formação de novos vasos e diminuindo a destruição de células do tecido através da inibição de apoptose das mesmas e de uma melhor irrigação das áreas de lesão.

Neste estudo, investigou-se o uso e a aplicação de células-tronco adultas de medula óssea de ratos, na função erétil de animais submetidos à lesão do nervo cavernoso, utilizando-se como parâmetro o retorno da mesma, após teste de ereção induzido pela apomorfina.

2. Objetivos

Avaliar a influência de células tronco adultas da medula óssea de ratos, na função erétil de animais submetidos à lesão do nervo cavernoso, utilizando-se como parâmetro o retorno da mesma, após teste de ereção induzido pela apomorfina.

3. Métodos

Quarenta e oito ratos Wistar-EPM machos, com idade entre 9 e 10 semanas, pesando aproximadamente 250 gramas, foram utilizados e subdivididos em quatro grupos de estudo (denominados como grupos I, II III e IV) contendo 12 animais cada, definidos mais adiante.

Os animais foram anestesiados com solução de ketamina e xilazina. Através de incisão mediana da sínfise púbica até a região abdominal média, os testículos eram então tracionados, o gubernáculo era ligado e as gônadas colocados no abdômen superior. A dissecação do nervo cavernoso foi realizada com a ajuda de um microscópio cirúrgico. O nervo cavernoso origina-se no gânglio pélvico maior, na fossa entre a uretra e o reto, e se divide abaixo da sínfise púbica inervando a uretra bulbar e o corpo cavernoso (Figuras 1,2 e 3).

A fáscia endopélvica acima do nervo cavernoso era incisada e o nervo seccionado e ressecado. O procedimento se repete no nervo contra-lateral. Após a secção dos nervos, nos grupos III e IV foi realizada a reconstituição do nervo com sondas guia de silicone, contendo solução fisiológica ou células-tronco adultas da medula óssea. Para o procedimento de reconstituição do nervo foram colocados quatro

pontos de reparo, dois em cada extremidade do nervo cavernoso utilizando-se fio de sutura de polipropileno 7-0 (Figura 4 A e B). Após os pontos reparados ressecou-se segmento neural de aproximadamente 3 mm, onde foi colocada a sonda guia de silicone, e fixada junto às extremidades do segmento do nervo cavernoso ressecado (Figura 5 A). Para o completo fechamento da sonda guia de silicone utilizou-se cola a base de cianoacrilato (Figura 5 B). Nesse momento, após o preparo da sonda guia de silicone, utilizada como ponte entre os segmentos do nervo cavernoso, foram injetadas as soluções contendo ou material salino ou células tronco de medula óssea (Figura 6).

Figura 1 - Desenho anatômico do nervo cavernoso.

Figura 2 - Foto-desenho do nervo cavernoso e sua localização.

Figura 3 - Nervo cavernoso após dissecção periprostática e abertura da fáscia endopélvica respectivamente.

A – Nervo Cavernoso

B- Nervo Cavernoso e pontos reparo prolene 7-0

Figura 4 - Nervo cavernoso (A) e Colocação pontos reparo (B).

A - Fixação da sonda guia junto às extremidades do nervo ressecado.

B- Fechamento com uso de cola.

Figuras 5 - Fixação da sonda guia junto às extremidades do segmento do nervo cavernoso ressecado (A) e fechamento com uso de cola (B).

Figura 6 - Injeção das soluções contendo material salino ou células tronco de medula óssea.

As amostras de medula óssea foram obtidas a partir de fêmures de ratos adultos (250 g) da linhagem Wistar ou Sprague Dawley GFP. Para cada período de cultivo foi utilizado um rato. Os animais foram sacrificados com superdosagem de anestésico (Tiopental sódico - Cristália; 3,5 mL/animal) e tiveram os dois fêmures dissecados, eliminando os tecidos muscular e conjuntivo associados. Em seguida, foram feitos dois cortes na região das epífises, removendo-as, possibilitando a entrada da agulha na cavidade medular para injeção de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - GibcoBRL) sem soro.

O material obtido foi ressuspenso e centrifugado a 1.500 rpm durante 10 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em DMEM sem soro, em um volume de cerca de 4 mL e transferido para um outro tubo de 15 mL contendo 4 mL de Ficoll-Paque (densidade 1.077 g/mL - Amersham Biosciences) (diluição Ficoll:meio de 1:1), evitando que as duas fases líquidas se misturassem. Centrifugou-se a 2.000 rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, coletou-se o anel de células na interface Ficoll-células, ressuspendidas em solução BSS, respeitando a diluição 1:5 (células:BSS). Centrifugou-se novamente o material a 1.500 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente, desprezando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes a fim de retirar o excesso de Ficoll, que é tóxico para as células.

Após a última lavagem, o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de DMEM com 20% de soro fetal bovino (SFB – StemCell Technology) e então as células foram contadas, utilizando Trypan Blue (GibcoBRL) para acessar a viabilidade das células extraídas. Por final, as células foram plaqueadas em frascos *canted neck* com filtro *Corning*, de 25 cm², com 5 mL de meio de cultura composto por DMEM 20% SFB acrescido de 1% de penicilina e estreptomicina (StemCell Technology) e de 4% de L-glutamina (GibcoBRL).

Foram plaqueadas 1×10^6 células e mantidas em estufa a 37 °C em 5% de CO₂ e umidade de 95%. O meio de cultura foi trocado a cada três ou quatro dias, retirando-se 4 mL do meio acondicionado e substituindo-se por 4 mL de meio fresco.

Quando as células em cultivo alcançavam confluência de aproximadamente 80%, era feita a passagem. Removendo o meio de cultura do frasco, as células mesenquimais permaneceram aderidas ao frasco. Essas células foram lavadas com DMEM sem soro para remover o SFB residual e depois incubadas com 1 mL de tripsina e EDTA (StemCell Technology), a 37 °C, até se destacarem (cerca de 4 minutos). Às células já soltas, adicionou-se meio de cultura com 20% de SFB para neutralizar a ação da tripsina. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por cinco minutos, então o sobrenadante foi

removido e o *pellet* ressuspensão em meio de cultura completa (DMEM + 20% SFB). Essas células foram divididas em novos frascos de 25 cm² para cultura. A cultura de células sofreu quatro passagens até a realização das cirurgias.

Durante a cirurgia, os animais do grupo IV receberam células mesenquimais espargidas no local da anastomose, bilateralmente, em um volume total de 500.000 células em 400 µL, por animal.

Os grupos experimentais foram divididos em:

Grupo I: exposição cirúrgica bilateral do nervo cavernoso sem lesão do mesmo.

Grupo II: lesão cirúrgica bilateral do nervo cavernoso de aproximadamente 3 mm, sem reconstituição.

Grupo III: lesão cirúrgica bilateral dos nervos cavernosos de aproximadamente 3 mm, e reconstituição bilateral com sondas guias de silicone contendo solução salina em seu interior.

Grupo IV: lesão cirúrgica bilateral dos nervos cavernosos de aproximadamente 3 mm, e reconstituição bilateral com sondas guias de silicone semeadas com células-tronco adultas em seu interior.

Quatro semanas após a cirurgia, os animais foram injetados com apomorfina (1 mg/kg, Sigma) para indução da ereção. Os comportamentos quanto à presença ou ausência de ereção foram avaliados até 30 minutos após a injeção de apomorfina. A recuperação da função erétil foi definida como uma ereção visível com um aumento de comprimento e turgor no corpo peniano (Figura 7).

Foram realizados testes estatísticos conforme partição do teste Qui-Quadrado. Fixou-se um valor de $p < 0,05$ para rejeição da hipótese de nulidade.

Figura 7 - Ereção peniana após teste com apomorfina.

4. Resultados

Nos animais do grupo I observou-se resposta erétil completa em todos os animais (100% - 12 em 12). Por outro lado, nenhum dos animais do grupo II apresentou ereções após administração de apomorfina.

Cinco dos doze animais do grupo III (41,7%) apresentaram ereções enquanto que nove dos 12 animais do grupo IV (75%) evidenciaram ereções após o estímulo (Tabela e Gráfico 1).

Quando foram comparadas as porcentagens de ereção nos quatro grupos, demonstrou-se que o grupo IV teve um comportamento semelhante ao grupo I ($p = 0,217$), ao passo que os animais do grupo III apresentaram frequência de ereções inferiores aos do grupo I ($p = 0,005$).

Por outro lado, a comparação dos resultados entre os grupos III e IV versus o grupo II, demonstrou que a frequência de ereções foi estatisticamente superior nos dois primeiros grupos ($p = 0,037$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Finalmente, o grupo IV apresentou tendência a maior número de ereções quando comparado ao grupo III (75% versus 41,7%), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,098$).

Tabela 1 - Frequência de animais com ereções induzidas nos diferentes grupos experimentais

Grupo	Ereções Induzidas	
	Presente	Ausente
Grupo I	12 (100%)	0 (0%)
Grupo II	0 (0%)	12 (100%)
Grupo III	5 (41,7%)	7 (58,3%)
Grupo IV	9 (75%)	3 (25%)

Gráfico 1 - Frequência de animais com ereções induzidas nos diferentes grupos experimentais

5. Discussão

A recuperação da função erétil após prostatectomia radical é dependente do processo de regeneração axônica relativamente lento e representa uma questão clínica crucial. A denervação prolongada do pênis leva a uma degeneração progressiva do músculo liso cavernoso, que é associada com perda da potência sexual ⁴². Mesmo com os refinamentos atuais das técnicas cirúrgicas, com preservação dos nervos cavernosos, a recuperação da função erétil pode levar até 18–24 meses, na maioria dos pacientes. Dessa forma, a aceleração da recuperação da integralidade dos nervos cavernosos é importante não somente no contexto da brevidade da restauração da função sexual, como ela também é relevante para aumentar a probabilidade de recuperação funcional da ereção peniana pós-operatória.

O presente estudo demonstrou que células-tronco adultas da medula óssea, semeadas em sondas guias de silicone, favorecem a regeneração dos nervos cavernosos e promovem o reestabelecimento da função erétil em um modelo animal.

Apesar de o enxerto de nervo ter sido, na maioria das vezes, usado para substituir nervos somáticos, sua eficácia para enxertar nervos autônomos tem sido também demonstrada. Os resultados do estudo atual, que demonstrou um resultado funcional superior com a implantação de sondas guias semeadas com células-tronco, levanta dúvidas com referência ao mecanismo subjacente. Os nervos periféricos têm a capacidade intrínseca para regenerar completamente e restabelecer a função, pelo menos em lesões nervosas limitadas. Contudo, quando um nervo é completamente dissecado e isolado, a estrutura guia permitindo a regeneração orientada e a reinervação adequada da estrutura alvo está ausente. Por conseguinte, a lógica principal para a correção das lesões nervosas completas envolve a aplicação de um molde unindo os segmentos seccionados. Autoenxertos de nervos periféricos podem representar essa estrutura guia. Contudo, é possível que axônios lesados não se regenerem adequadamente através do nervo enxertado, mas, ao contrário, ao redor do mesmo. Com isso, o feixe nervoso pode não reencontrar e reinervar a área alvo original, ocasionando uma recuperação funcional incompleta ou ausente da estrutura alvo.

A estratégia por nós utilizada no presente experimento, empregando sondas guias semeadas com células-tronco entre as terminações nervosas lesadas, ao invés de permitir o desenvolvimento

irregular de axônios regeneradores, direcionam os mesmos especificamente para a área alvo original. Essa noção é amparada pela constatação de que mesmo sondas guias não semeadas induziram a recuperação de função em quase 42% dos animais. Adicionalmente, células-tronco semeadas dentro destas sondas fornecem fatores tróficos e expressam moléculas de adesão celular e componentes de matriz extracelular, que favorecem ainda mais a taxa de recuperação funcional peniana.

A idéia de enxerto de nervo periférico aplicado à recuperação dos nervos cavernosos e recuperação da potência sexual foi introduzida por Quinlan et al ¹⁷ e experimentos similares foram realizados por Ball et al ¹⁹, mostrando experimentalmente que enxertos do nervo genitofemoral promovem a restauração da função erétil em animais antes de quatro meses da cirurgia. Vale lembrar que enxertos de nervos normais não oferecem um ambiente muito favorável para o desenvolvimento axônico, ao passo que enxertos isolados de nervos pré-degenerados ⁴³ e ou utilizados com moldes sintéticos ⁴⁴ aumentam a regeneração axônica. Dentro do nervo degenerado as células de Schwann respondem rapidamente à perda de contato axônico pela regulação negativa de genes de mielina, desdiferenciação e proliferação. Alterações moleculares incluem a regulação positiva de neurotrofinas, moléculas de adesão de

células neurais, citocinas e outros fatores solúveis e seus correspondentes receptores, que orientam as fibras regeneradoras ⁴⁵.

Os resultados do presente estudo são altamente promissores, podendo servir de base para a aplicação clínica de sondas guias semeadas com células-tronco, para recuperar a estrutura de nervos cavernosos lesados e a função erétil em homens submetidos à prostatectomia radical, num futuro próximo. Tais células podem ser replicadas em cultura, semeadas dentro de sondas guias e aplicadas nas cirurgias de prostatectomia radical para a reconstituição dos nervos cavernosos.

Existem algumas questões práticas envolvendo o conceito de enxerto do nervo cavernoso que ainda precisam ser resolvidas. Haverá, concebivelmente, uma proporção de homens que desenvolvem denervação cavernosa e que permanecem com resíduos tumorais na loja prostática após a intervenção cirúrgica. Se esses homens forem candidatos a receber na cirurgia enxertos de sondas de silicone contendo células-tronco de medula óssea ou outra matriz, como por exemplo células de Schwann que secretam fatores neurotróficos ⁸; células cancerígenas residuais, poderiam ter seu crescimento estimulado pelos fatores tumorais liberados localmente, complicando a evolução do paciente.

Embora a preservação dos feixes neuro-vasculares cavernosos represente a melhor solução para se preservar a função erétil na prostatectomia radical, está se tornando cada vez mais comum na prática se ressecar esses feixes, especialmente em um dos lados, com base em resultados de biópsia adversos unilateralmente. Isto irá incentivar, previsivelmente, um interesse adicional nas estratégias de reparação dos nervos cavernosos. Essa abordagem também teria aplicações em outros cenários cirúrgicos, tais como, ressecções abdomino-perineais e nas cistectomias radicais.

Outro uso potencial de reconstituição de nervos que não tem sido explorado é o seu uso como um molde protetor para aumentar a reparação de nervos parcialmente danificados, mas ainda presentes. Uma grande proporção de homens requer a tintura do tempo para recuperar a função erétil após a realização de uma prostatectomia radical com preservação de ambos os nervos. O uso de sondas ou moldes de silicone com produção intensificada de fatores neurotróficos poderia acelerar a recuperação da função erétil em tais homens.

A substituição do nervo cavernoso é um assunto que tem despertado o interesse e debate médico. Não obstante, os novos conhecimentos, incluídos os gerados pelo presente estudo, talvez venham produzir uma situação de ganho mútuo para homens submetidos

à cirurgia da próstata ou outra cirurgia pélvica e os especialistas. A restauração da função sexual após intervenções pélvicas contribuirá para a melhor qualidade de vida dos pacientes afligidos e maior satisfação dos médicos comprometidos com a cura e com o usufruto pleno da existência de seus pacientes.

6. Conclusões

O presente estudo demonstra que células-tronco adultas da medula óssea, semeadas em sondas guias de silicone, podem favorecer a regeneração dos nervos cavernosos e promovem reestabelecimento da função erétil em um modelo animal em 75% dos casos.

7. Anexos

BJUI
BJU INTERNATIONAL

The development of a rat model of erectile dysfunction after radical prostatectomy: preliminary findings

Oskar Kaufmann, Joaquim Claro, Jose Cury, Enrico Andrade, Beatriz Longo*, Wilson Aguiar*, Luiz Mello* and Miguel Srougi

*Division of Urology, University of Sao Paulo and *Department of Physiology, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil*

Accepted for publication 22 February 2008

OBJECTIVE

To develop a rat model of erectile dysfunction (ED) after cavernous nerve injury.

MATERIALS AND METHODS

Given the great similarity between the anatomical structure of the cavernous nerve in rats and humans, 24 rats underwent dissections and the cavernous nerves were identified with the aid of an operating microscope. Then the rats were randomized into two groups: sham-operated controls and a bilateral cavernous nerve section

group. At 3 months after surgery, the rats were evaluated for their response to an apomorphine challenge.

RESULTS

The erectile response after an apomorphine challenge was normal in all the control rats, while there were no erections in the bilateral injured group.

CONCLUSION

The rat major autonomic ganglion and its cavernous nerve can be identified with the aid of a microscope. Rats are inexpensive

and easy to handle, thus a good animal for developing an ED model of cavernous nerve injury. In the present study, the rats with cavernous nerve injury lost erectile capacity in a reliable and reproducible fashion. Because of the great similarity between the cavernous nerve of rats and humans, one may consider this technique as a reliable experimental model for studying ED after radical prostatectomy.

KEYWORDS

erectile dysfunction, animal model, cavernous nerve

INTRODUCTION

Erectile dysfunction (ED) is recognized as a medical condition, presenting multifactorial and complex aetiology related to the ageing of the population and plurimetabolic diseases. Radical prostatectomy (RP) is the main technique used for curative treatment of localized prostate carcinoma [1,2]. However, ED is a major complication of this surgery, generally caused by injury of the cavernous nerve given its close proximity to the prostate [3]. Traction, laceration and compression are the most common types of peripheral nerve injury potentially leading to ED in these patients [4]. Based upon these facts there has been a resurgence of interest in basic research of the erectile process under normal and abnormal conditions.

Many animal models of cavernous nerve injury, using different species such as dogs and monkeys, have been used in previous studies of this kind due to the facility of

identification of the cavernous nerve, bigger than the rats' similar plexus, which is too small to be identified with the naked eye. The purchase and maintenance costs of these large animals for medical research has become a problem. Because of the great similarity between the cavernous nerve of rats and humans, in addition to cost-effectiveness and easy handling, we developed a rat model of ED, identifying the rat cavernous nerve and lesioning this nerve.

MATERIALS AND METHODS

In all, 24 male Wistar-EPM rats (3 months old, 300–350 g) were randomly divided into two equal groups. One group (uninjured controls) had a sham operation, while the remaining group had bilateral cavernous nerve injury. All institutional and national guidelines for animal safety and comfort were strictly followed and surgery was done with local ethical approval and is consistent with global ethical requirements.

The surgery was done under ketamine and xylazine anaesthesia. Isothermia was maintained at 37 °C by placing the rats on a heating pad. A lower abdominal midline incision was made from the symphysis pubis to mid-abdomen. The testes were retracted, their gubernacula were divided and they were packed into the upper abdomen. An operating microscope aided dissection. The cavernous nerve exits the major pelvic ganglion in the groove between the urethra and rectum, dividing under the symphysis and finally innervating the bulbous urethra and corpora cavernosa. There were also were numerous fine nerve fibres coursing from the major pelvic ganglion in all directions toward the pelvic viscera. The endopelvic fascia overlying the cavernous nerve was incised and after periprostatic dissection, the nerve and the major pelvic ganglion were identified posterolaterally on either side of the prostate (Fig. 1). The uninjured controls had no further manipulation. In the remaining group the cavernous nerves were isolated and then injured by sharply excising a segment creating

FIG. 1. The cavernous nerve after periprostatic dissection and opening of the endopelvic fascia.

FIG. 2. Erection after apomorphine test injection.

a 3 mm gap. Collateral fibres to the cavernous nerves were also carefully dissected. The procedure was repeated on the contralateral side.

At 3 months after the surgical procedure both groups were given the apomorphine test. Apomorphine solution (0.05 mg/kg) was injected in the loose skin of the back of the neck to induce an erection, based upon the fact that microinjection of apomorphine (a dopamine agonist) into the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) induced penile erection in rats and was identical to that induced by the systemic administration of the drug, suggesting that the PVN is the brain area where dopamine agonists act to induce penile erection [5]. After apomorphine administration each rat was observed for 30 min, especially for penile erections. An erection was only counted when the emergence of an engorged glans penis and distal shaft was noted (Fig. 2).

RESULTS

As shown in Fig. 3 the rat major pelvic ganglion lies on either side of the dorsolateral

FIG. 3. Anatomical and line drawing of the cavernous nerve and its location.

lobes of the prostate. It receives innervation from the sacral parasympathetic nuclei via the pelvic nerve and from thoracolumbar outflow via the hypogastric nerve. The largest efferent nerve runs along the lateral aspect of the urethra without branching. This nerve is termed the cavernous nerve.

The apomorphine test had an effect a few minutes after s.c. injection and it lasted for ≈ 30 min. During this period, all rats were more active, with hair standing, stretching and yawning. All the rats in the control group (uninjured nerves) responded to the apomorphine test with erections for several minutes. In the bilateral cavernous nerve injury group there were no erections in any of the rats. When this group was compared with the control rats there was a complete loss of erectile capacity for a period as long as 3 months after surgery.

DISCUSSION

RP for prostate cancer is a widely utilized curative treatment for localized prostate carcinoma [2] but the sequelae, such as ED and urinary incontinence, have profound effects on quality of life. Walsh *et al.* [6] popularized nerve-sparing RP, which decreases the rate of ED after RP but many patients at risk of positive margins by virtue of stage ($\geq T2b$), grade ($\geq$ Gleason 7) or PSA level (>15 ng/mL) may not be candidates for a nerve-sparing procedure [7]. The cavernous nerve has to be resected bilaterally or unilaterally in the process of radically removing the cancer. Like other peripheral nerves the cavernous nerves have the intrinsic capacity to regenerate fully and restore function, at least in limited nerve lesions.

However, after the nerve is transected completely the guidance structure allowing orientated regrowth and proper target reinnervation is missing [8]. Transection of the fibre results in distal fragmentation of axon and myelin sheaths [9].

Although the precise anatomy may differ from species to species, the overall framework of rat pelvic autonomic innervation is remarkably similar to that of humans and other animals. In mammals, the main constitution is the pelvic plexus that is formed by the joining of the thoracolumbar sympathetic fibres via the hypogastric nerve and sacral parasympathetic fibres via the pelvic nerve. The largest efferent branch is the cavernous nerve. In rats, the major pelvic ganglion and its cavernous nerve can be easily identified with the aid of a surgical microscope. With reference to the basic anatomy of the cavernous nerve [10,11], the major pelvic ganglion were exposed in the posterolateral surface of the dorsal lobes of the prostate. Based on the ganglion, its inflows (hypogastric nerve and pelvic nerve) and outflow (cavernous nerve) were all identified.

At 3 months after cavernous nerve injury, the rat model was evaluated using the apomorphine test. It is well documented that a low dose of apomorphine causes penile erection, stretching and yawning syndrome in rats [5]. This action is mediated by dopamine receptors in the PVN of the hypothalamus. In the present study, all rats after apomorphine injection were more active, with hair standing, stretching and yawning. All rats in the control group had

KAUFMANN ET AL.

recorded penile erections. Conversely, for the cavernous nerve injury group, there were no erections, suggesting that bilateral cavernous nerve injury can lead to ED after injury. The apomorphine test evaluates erectile response directly, but it cannot show alterations in haemodynamics in the corpus cavernous tissue. The present bilateral cavernous nerve injury proved to be a simple and reproducible method resulting in the loss of penile erection. We could easily identify the rat cavernous nerve, induce injury and develop a rat model of ED caused by cavernous nerve injury. This rat model could be widely used as rats are inexpensive, readily available and the cavernous nerve can be easily identified.

In conclusion, the rat major ganglion and its cavernous nerve can be identified with the aid of a microscope. Rats are inexpensive and easy to handle, thus making a very good animal for developing an ED model caused by cavernous nerve injury. The present study showed that rats in the group with cavernous nerve injury consistently lost erectile capacity, thus producing a reliable model of ED caused by cavernous nerve injury. Because of the of the great similarity between the cavernous nerves of rats and humans in addition to ready availability, rats may constitute an appropriate experimental model for studying ED after RP.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support provided by Institutos do Milênio de Bioengenharia Tecnológica, CNPq (Brazil).

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

- 1 American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2006*. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2006. Available at: http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0.asp. Accessed March 2008
- 2 Graefen M, Walz J, Huland H. Open retropubic nerve-sparing radical prostatectomy. *Eur Urol* 2006; **49**: 38–48
- 3 Lepor H. Radical prostatectomy: status and opportunities for improving outcomes. *Cancer Invest* 2004; **22**: 435–44
- 4 Walsh PC, Donker PJ. Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention. *J Urol* 1982; **128**: 492–7
- 5 Melis MR, Argiolas A, Gessa GL. Apomorphine-induced penile erection and yawning: site of action in brain. *Brain Res* 1987; **415**: 98–104
- 6 Walsh PC, Marschke P, Ricker D, Burnett AL. Patient-reported urinary continence and sexual function after anatomic radical prostatectomy. *Urology* 2000; **55**: 58–61
- 7 Klotz L. Advances in nerve sparing for radical prostatectomy. *Urology* 1999; **54**: 956–9
- 8 May F, Weidner N, Matiassek K *et al*. Schwann cell seeded guidance tubes restore erectile function after ablation of cavernous nerves in rats. *J Urol* 2004; **172**: 374–7
- 9 Verdu E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst* 2000; **5**: 191–208
- 10 Walsh PC. Anatomic radical prostatectomy: evolution of surgical technique. *J Urol* 1998; **160**: 2418–24
- 11 Lue TF, Zeineh SJ, Schmidt RA, Tanagho EA. Neuroanatomy of penile erection: its relevance to iatrogenic impotence. *J Urol* 1984; **131**: 273–80

Correspondence: Oskar Kaufmann, Department of Urology, University of Sao Paulo, rua brasil 136 sao paulo, Sao Paulo 04534-040, Brazil.
e-mail: o_kaufmann@yahoo.com.br

Abbreviations: ED, erectile dysfunction; RP, radical prostatectomy; PVN, paraventricular nucleus.

8. Referências

- 1- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58:71-96.
- 2- Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004;16:E1.
- 3- Hall S. The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg B*. 2005;87:1309-19.
- 4- Walsh PC. Anatomic radical retropubic prostatectomy. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan Jr ED, Wein AJ, editors. *Campbell's urology*. 7th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1998, chapt. 86, p.2565.
- 5- Klotz L, Herschorn S. Early experience with intraoperative cavernous nerve stimulation with penile tumescence monitoring to improve nerve sparing during radical prostatectomy. *Urology*. 1998;52: 537-42.
- 6- Kim ED, Scardino PT, Hampel O, Mills NL, Wheeler TM, Nath RK. Interposition of sural nerve restores function of cavernous nerves resected during radical prostatectomy. *J Urol*. 1999;161:188-92.
- 7- Walsh PC. Nerve grafts are rarely necessary and are unlikely to improve sexual function in men undergoing anatomic radical prostatectomy. *Urology*. 2001;57:1020.
- 8- May F, Weidner N, Matiasek K, Caspers C, Mrva T, Vroemen M, Henke J, Lehmer A, Schwaibold H, Erhardt W, Gansbacher H, Hartung R. In: *Schwann cell seeded guidance tubes restore erectile function after ablation of cavernous nerves in rats*;J.Urol. 2004; p.374-7.

- 9- Fandel TM, Bella AJ, Tantiwongse K, Garcia M, Nunes L, Thüroff JW, Tanagho EA, Pohl J, Lue TF. The effect of intracavernosal growth differentiation factor-5 therapy in a rat model of cavernosal nerve injury. *BJU Int.* 2006;98:632-6.
- 10- Pereira Lopes FR. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Exp Neurol.* 2006;198:457-68.
- 11- Stephanian E, Sekhar LN, Janecka IP, Hirsch B. Facial nerve repair by interposition nerve graft: results in 22 patients. *Neurosurgery.* 1992;31:73-6.
- 12- Baker DC, Conley J. Facial nerve grafting: a thirty-year retrospective review. *Clin Plast Surg.* 1979;6:343-60.
- 13- Sedel L, Nizard RS. Nerve grafting for traction injuries of the common peroneal nerve. A report of 17 cases. *J Bone Joint Surg Br.* 1993;75:772-4.
- 14- Staniforth P, Fisher TR. The effects of sural nerve excision in autogenous nerve grafting. *Hand.* 1978;10:187-90.
- 15- van Lith-Bijl JT, Stolk RJ, Tonnaer JA, Groenhout C, Konings PN, Mahieu HF. Laryngeal abductor reinnervation with a phrenic nerve transfer after a 9-month delay, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124:393-8.
- 16- Bernardi L, Valenti C, Wdowczyck-Szulc J, Frey AW, Rinaldi M, Spadacini G, Passino C, Martinelli L, Viganò M, Finardi G. Influence of type of surgery on the occurrence of parasympathetic reinnervation after cardiac transplantation. *Circulation.* 1998;97:1368-74.
- 17- Quinlan DM, Nelson RJ, Walsh PC. Cavernous nerve grafts restore erectile function in denervated rats. *J Urol.* 1991;145:380.

- 18- Burgers JK, Nelson RJ, Quinlan DM, Walsh PC. Nerve growth factor, nerve grafts and amniotic membrane grafts restore erectile function in rats. *J Urol*. 1991;146:463-8.
- 19- Ball RA, Lipton SA, Dreyer EB, Richie JP, Vickers MA. Entubulization repair of severed cavernous nerves in the rat resulting in return of erectile function. *J Urol*. 1992;148:211.
- 20- Ball RA, Richie JA, Vickers Jr MA. Microsurgical nerve graft repair of the ablated cavernosal nerves in the rat. *J Surg Res*. 1992;53:280-6.
- 21- Walsh PC. Nerve grafts are rarely necessary and are unlikely to improve sexual function in men undergoing anatomic radical prostatectomy. *Urology*. 2001;1020-4.
- 22- Kim ED, Scardino PT, Hampel O, Mills NL, Wheeler TM, Nath RK. Interposition of sural nerve restores function of cavernous nerves resected during radical prostatectomy. *J Urol*. 1999;161:188-92.
- 23- Kim ED, Nath R, Kadmon D, Lipshultz LI, Miles BJ, Slawin KM, Tang HY, Wheeler T, Scardino PT. Bilateral nerve graft during radical retropubic prostatectomy: 1-year followup. *J Urol*. 2001;165:1950-6.
- 24- Kim ED, Nath R, Slawin KM, Kadmon D, Miles BJ, Scardino PT. Bilateral nerve grafting during radical retropubic prostatectomy: extended follow-up. *Urology*. 2001;58 983-7.
- 25- Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, Rafii D, Lyden D Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol*. 2002;13:61-7.
- 26- Zhang, ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res*. 2002;90:284-8.

-
- 27- Eglitis MA, Dawson D, Park KW, Mouradian MM. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport*. 1999;10:1289-92
 - 28- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-92.
 - 29- Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J*. 1993;7:1031-8
 - 30- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From bone marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290(5497):1775-9.
 - 31- Kucia M, Reca R, Jala VR, Dawn B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Bone marrow as a home of heterogeneous populations of non-hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2005;19:1118-27
 - 32- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284:143-7.
 - 33- Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003;57:11-20
 - 34- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75:389-97.
 - 35- Bartholomeu A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002;30:42-8.

-
- 36- Soares MB, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-de-Carvalho L, de Carvalho AC, Ribeiro-dos-Santos R. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol.* 2004;164:441-7.
- 37- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004;8:301-16.
- 38- Hamada H, Kobune M, Nakamura K, Kawano Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Sci.* 2005;96:149-56.
- 39- Belmadani A, Tran PB, Ren D, Miller RJ. Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. *J Neurosci.* 2006;26:3182-91.
- 40- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006 [Epub ahead of print].
- 41- Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani G, Martinello M, Cattalini A, Bergami A, Furlan R, Comi G, Constantin G, Martino G. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature.* 2006;436(7048):266-71.
- 42- Klein LT, Miller MI, Buttyan R, Raffo AJ, Burchard M, Devris G, Cao YC, Olsson C, Shabsigh R. Apoptosis in the rat penis after penile denervation. *J Urol.* 1997;158:626-30.
- 43- Kerns JM, Danielsen N, Holmquist B, Kanje M, Lundborg G. The influence of predegeneration on regeneration through peripheral nerve grafts in the rat. *Exp Neurol.* 1993;122:28-36.

-
- 44- Rodríguez FJ, Gómez N, Labrador RO, Butí M, Ceballos D, Cuadras J, Verdú E, Navarro X. Improvement of regeneration with predegenerated nerve transplants in silicone chambers. *Restor Neurol Neurosci.* 1999;14:65-79.
 - 45- Liu MH. Growth factors and extracellular matrix in peripheral nerve regeneration, studied with a nerve chamber. *J Periph Nerv Syst.* 1996;2:97.