

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

ANA PAULA MAGRINI IACOPUCCI

**A HEMÓLISE INTRAVASCULAR LEVA AO RELAXAMENTO
EXAGERADO DO MÚSCULO LISO DO CORPO CAVERNOSO
EM CAMUNDONGOS:
IMPLICAÇÃO PARA O PRIAPISMO NA ANEMIA FALCIFORME**

Bragança Paulista
2025

ANA PAULA MAGRINI IACOPUCCI - R.A.: 202113354

**A HEMÓLISE INTRAVASCULAR LEVA AO RELAXAMENTO
EXAGERADO DO MÚSCULO LISO DO CORPO CAVERNOSO
EM CAMUNDONGOS:
IMPLICAÇÃO PARA O PRIAPISMO NA ANEMIA FALCIFORME**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Fábio Henrique da Silva

Bragança Paulista
2025

WH 170 I12h	Iacopucci, Ana Paula Magrini A hemólise intravascular leva ao relaxamento exagerado do músculo liso do corpo cavernoso em camundongos: implicação para o priapismo na anemia falciforme / Ana Paula Magrini Iacopucci. – Bragança Paulista, 2025. 44 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. Orientação de: Fábio Henrique da Silva. 1. Anemia falciforme. 2. GMP cíclico. 3. disfunção erétil. 4. Óxido nítrico. 5. Nucleotídeo Cíclico Fosfodiesterase do Tipo 5. I. Silva, Fábio Henrique da. II. Título.
----------------	---

Sistema de Bibliotecas da Universidade São Francisco – USF
Ficha catalográfica elaborada por: Lohana Coelho Souza - CRB-8/10064



Educando para a paz

IACOPUCCI, Ana Paula Magrini. “A Hemólise intravascular leva ao relaxamento exagerado do músculo liso do corpo cavernoso em camundongos: implicação para o priapismo na anemia falciforme”. Tese defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 23 de junho de 2025 pela Banca examinadora constituída pelos membros:

Prof(a). Dr(a). Fábio Henrique da Silva - Orientador(a) e Presidente
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Carolina Afonso de Lima
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Fernanda Marconi Roversi
(por videoconferência)
Universidade Estadual de Campinas

Prof(a). Dr(a). Mariana Gonçalves de Oliveira Taranto
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Wilson Alves Ferreira Júnior
(por videoconferência)
Faculdade São Leopoldo Mandic

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico esta conquista, primeiramente, a Deus — pela dádiva da vida, pela sabedoria concedida e pela força nos momentos de incerteza.

Aos meus amados pais, Eunice e Alcides (in memoriam), meus primeiros mestres, exemplos de dignidade e dedicação. Sou eternamente grata pelo amor incondicional, pelos ensinamentos sobre o valor do conhecimento e por nunca medirem esforços para me apoiar em cada etapa da minha jornada.

À minha filha, Heloísa — minha maior inspiração e razão de viver. Em muitos momentos, sem sequer perceber, foi ela quem me deu forças para não desistir. Este caminho foi trilhado por ela e sempre será por ela.

Ao meu esposo, Rafael, meu companheiro de vida, pela paciência, compreensão e por nunca deixar de acreditar em mim. Seu apoio constante foi fundamental para que eu seguisse firme em direção aos meus objetivos.

À minha família e aos amigos queridos, que estiveram presentes com palavras de incentivo, gestos de carinho e apoio genuíno — cada um, à sua maneira, contribuiu para que esta vitória se tornasse possível.

Ao meu orientador, Professor Dr. Fábio, registro minha gratidão. Obrigada por confiar em mim, por me guiar com sabedoria e por compartilhar com tanta generosidade seus conhecimentos. Sua paciência, dedicação e excelência acadêmica foram essenciais na minha formação como pesquisadora.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença genética autossômica recessiva decorrente de mutações no gene da globina beta, levando à síntese de uma hemoglobina anômala (HbS). Em condições de baixa tensão de oxigênio, a HbS sofre polimerização, causando deformação das hemácias, que assumem o formato característico de foice. Essas células alteradas apresentam maior fragilidade e são destruídas precocemente na circulação, gerando uma hemólise intravascular crônica. Esse fenômeno desencadeia diversas complicações clínicas graves, como crises vaso-oclusivas, acidentes vasculares encefálicos, disfunções orgânicas crônicas e priapismo. Estudos clínicos anteriores já demonstraram uma correlação positiva significativa entre episódios de priapismo e níveis elevados de hemólise intravascular em indivíduos com AF. Contudo, até o momento, não existiam estudos experimentais demonstrando diretamente o impacto da hemólise intravascular sobre a função erétil. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da hemólise intravascular induzida por fenilhidrazina (PHZ) sobre a função relaxante da musculatura lisa do corpo cavernoso em modelo murino, bem como investigar o papel da hemólise intravascular no aumento do estresse oxidativo peniano. Inicialmente, analisamos a influência da hemólise intravascular nos mecanismos de relaxamento dos corpos cavernosos. Os relaxamentos induzidos por acetilcolina (1 nM - 10 μ M) e estimulação elétrica (EFS, 2-32 Hz) foram significativamente maiores no grupo tratado com PHZ em relação ao controle. Houve aumento significativo da expressão proteica da heme oxigenase-1 (HO-1) no grupo PHZ, sem alterações significativas na expressão da fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5). A pré-incubação com o inibidor específico da HO-1 (composto 1J, 10 μ M) reverteu o aumento das respostas relaxantes induzidas pela acetilcolina e EFS no grupo PHZ. Além disso, a produção basal de GMPc foi reduzida nos animais tratados com PHZ. Na segunda etapa, investigamos o papel da hemólise intravascular na indução do estresse oxidativo peniano. Observou-se aumento significativo na expressão proteica de NADPH oxidase 2 (NOX-2), 3-nitrotirosina (3-NT) e 4-hidroxinonenal (4-HNT) no corpo cavernoso dos animais submetidos à hemólise. Em conjunto, nossos resultados demonstram que a hemólise intravascular promove um relaxamento exacerbado da musculatura lisa do corpo cavernoso, associado ao aumento da expressão de HO-1 e ao estresse oxidativo mediado por NOX-2. Esses resultados experimentais corroboram estudos clínicos prévios que estabelecem uma forte relação entre níveis elevados de hemólise intravascular e o priapismo na anemia falciforme, contribuindo para uma melhor compreensão da fisiopatologia envolvida.

PALAVRAS-CHAVE: anemia. GMP cíclico. disfunção erétil. óxido nítrico. Nucleotídeo Cíclico Fosfodiesterase do Tipo 5

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is an autosomal recessive genetic disease resulting from mutations in the beta-globin gene, leading to the synthesis of abnormal hemoglobin (HbS). Under low oxygen tension, HbS polymerizes, causing deformation of red blood cells, which assume the characteristic sickle shape. These altered cells exhibit increased fragility and undergo premature destruction in circulation, resulting in chronic intravascular hemolysis. This phenomenon triggers severe clinical complications, such as vaso-occlusive crises, stroke, chronic organ dysfunction, and priapism. Previous clinical studies have demonstrated a significant positive correlation between priapism episodes and elevated levels of intravascular hemolysis in individuals with SCA. However, until now, no experimental studies have directly demonstrated the impact of intravascular hemolysis on erectile function. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of intravascular hemolysis induced by phenylhydrazine (PHZ) on the relaxation function of corpus cavernosum smooth muscle in a murine model, as well as to investigate the role of intravascular hemolysis in promoting penile oxidative stress. Initially, we analyzed the influence of intravascular hemolysis on the relaxation mechanisms of cavernous bodies. Relaxation responses induced by acetylcholine (1 nM - 10 μ M) and electrical field stimulation (EFS, 2-32 Hz) were significantly greater in the PHZ-treated group compared to controls. A significant increase in the protein expression of heme oxygenase-1 (HO-1) was observed in the PHZ group, without significant changes in the expression of phosphodiesterase type 5 (PDE5). Pre-incubation with a specific HO-1 inhibitor (compound 1J, 10 μ M) reversed the enhanced relaxation responses induced by acetylcholine and EFS in the PHZ group. Additionally, basal cyclic GMP (cGMP) production was reduced in PHZ-treated animals. In the second stage, we investigated the role of intravascular hemolysis in inducing penile oxidative stress. A significant increase in the protein expression of NADPH oxidase 2 (NOX-2), 3-nitrotyrosine (3-NT), and 4-hydroxynonenal (4-HNT) was observed in the corpus cavernosum of hemolysis-subjected animals. Collectively, our findings demonstrate that intravascular hemolysis promotes exaggerated relaxation of corpus cavernosum smooth muscle, associated with increased HO-1 expression and oxidative stress mediated by NOX-2. These experimental results support previous clinical studies establishing a strong relationship between elevated intravascular hemolysis levels and priapism in sickle cell anemia, contributing to a better understanding of the underlying pathophysiology.

KEYWORDS: *anemia. cyclic GMP. erectile dysfunction. nitric oxide. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases, Type 5*

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações:

3-NT	3-nitrotirosina
4-HNT	4-hidroxinonenal
ACh	Acetilcolina
AF	Anemia falciforme
CO	Monóxido de carbono
DF	Doença falciforme
EFS	Estimulação de campo elétrico
E.P.M.	Erro padrão da média
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
Hb	Hemoglobina
HbS	Hemoglobina S (HbS)
HO-1	Heme oxigenasse-1
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O₂⁻	Ânion superóxido
PDE5	Fosfodiesterase tipo 5
PHZ	Fenilhidrazina
TCA	Ácido tricloroacético

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Secção mediana, vista lado esquerdo da pelve masculina. (PAULSEN, Friedrich, 2019).....	15
FIGURA 2 - Via de relaxamento do músculo liso cavernoso. IP3, trifosfato de Inositol; Ca ²⁺ , Cálcio; NO, Óxido nítrico; eNOS, Óxido nítrico sintase endotelial; nNOS, Óxido nítrico sintase neuronal; PDE5, Fosfodiesterase 5.	21
FIGURA 3 – Via de contração do músculo liso cavernoso. IP3, trifosfato de Inositol; Ca ²⁺ , Cálcio; NA, Noradrenalina; SNS, sistema nervoso simpático.....	22
FIGURA 4 - Estrutura quaternária geral da Hb. (a) duas cadeias alfa e beta coloridas em cinza e bege, respectivamente. (b) Estrutura da Hb oxigenada (estado R) (magenta) sobreposta à estrutura da Hb desoxigenada (estado T) (azul). (Adaptado de Ahmed; Ghatge; Safo, 2020).25	
FIGURA 5 - A hemólise intravascular aumenta a ativação da HO-1 com aumento da produção de CO. Hb, Hemoglobina; HO-1, Heme oxigenase – 1; CO, Monóxido de carbono.	27
FIGURA 6 - Via CO – GCs –GMPc nos corpos cavernosos. CO, Monóxido de carbono; GCs, Guanilil ciclato solúvel; GTP, Guanosina trifosfato; GMPc, Monofosfato cíclico de guanosina. .	29
FIGURA 7 – Papel do estresse oxidativo no priapismo na anemia falciforme. O ₂ ⁻ , ânions superóxido; 4-HNE, 4-Hidroxinonenal; 3-NT, 3-Nitrotirosina; NO, Óxido nítrico; PDE5, Fosfodiesterase 5; GMPc, Monofosfato cíclico de guanosina; NADP, Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina; NADPH, Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Hidrogênio.	31
FIGURA 8 - Parâmetros Hematológicos em Camundongos Tratados com PHZ. (A) eritrócitos, (B) hematócrito, (C) hemoglobina total e (D) hemoglobina plasmática. Os dados são mostrados como média ± E.P.M. de 8 camundongos por grupo. *p < 0,05 vs. grupo controle. Teste t de Student não pareado.	39
FIGURA 9 – Curvas concentração-resposta para acetilcolina e frequência resposta a estimulação elétrica em corpos cavernosos de camundongos. (A) Curvas concentração-resposta para ACh e (B) respostas de relaxamento ao EFS em fragmentos de corpo cavernoso de camundongos controle e PHZ. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. de 6 camundongos por grupo. *p < 0,05 vs grupo controle. #p < 0,05. Teste t de Student não pareado.	40
FIGURA 10 - Expressão proteica de PDE5 e heme oxigenase-1 em corpo cavernoso de camundongo. Imagens representativas de western blotting (painéis superiores) e quantificação das respectivas proteínas (painéis inferiores) para (A) PDE5 (n = 9) e (B) HO-1 (n = 8) em homogeneizados de corpo cavernoso de camundongos dos grupos controle e tratados com PHZ. Os dados são mostrados como média ± E.P.M. Teste t de Student não pareado.....	41
FIGURA 11 – Curvas concentração resposta para acetilcolina e frequência resposta para EFS em corpos cavernosos de camundongos pré incubados com inibidor da heme oxigenase. (A) Concentração-resposta curvas para ACh e (B) respostas de relaxamento ao EFS em fragmentos de corpo cavernoso de camundongos controle e PHZ na ausência ou presença de 1 J (10 ⁻⁵ M). Os dados são apresentados como média ± E.P.M. de 6 camundongos por grupo. *p < 0,05 vs grupo de controle. #p < 0,05 vs. grupo PHZ. Análise estatística realizada por ANOVA, seguida do teste de Tukey.	43
FIGURA 12 – Expressão proteica de N3ADPH subunidade oxidase NOX-2 e marcadores de estresse oxidativo em corpos cavernosos de camundongos. Imagens representativas de western blotting (painéis superiores) e valores de proteína (painéis inferiores) para (A) NOX-	

2 (n = 4–5) (B) 3-NT (n = 9) e (C) 4-HNE (n = 9) em homogeneizados do corpo cavernoso de camundongos controle e PHZ. Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. *p < 0,05 vs. grupo controle. Teste t de Student não pareado..... 43

FIGURA 13 - Efeito da hemólise intravascular nos níveis de GMPc em corpo cavernoso de camundongos. Conteúdo basal de GMPc do corpo cavernoso de os grupos controle e PHZ. Os dados são mostrados como média $\pm$ E.P.M. de 6 camundongos por grupo. *p < 0,05 vs. grupo controle. Teste t de Student não pareado..... 44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Anatomia Peniana.....	14
2.2. Inervação Peniana.....	17
2.3. Vascularização peniana	18
2.4. Hemodinâmica Peniana.....	19
2.6. Anemia Falciforme e priapismo	23
2.7. Anemia Falciforme e Hemólise intravascular.....	25
2.9. Fisiopatologia do Priapismo (NO – GMPc – Heme Oxigenase)	28
2.10. Papel do estresse oxidativo na fisiopatologia do priapismo na anemia falciforme...	30
2.11. Modelo animal de hemólise intravascular.....	32
3. OBJETIVO GERAL	33
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Animais e modelo de hemólise intravascular	34
4.2 Parâmetros Hematológicos	34
4.3 Preparação da musculatura lisa cavernosa.....	35
4.4 Curva concentração-resposta	35
4.5 Estimulação elétrica	36
4.6 Inibidor da Heme Oxigenase.....	36
4.7 Western Blotting.....	37
4.8 Determinação dos níveis de GMPc.....	37
4.9 Análise estatística	37
5. RESULTADOS	39

5.1 Parâmetros Hematológicos em Camundongos Tratados com PHZ.....	39
5.2 A hemólise intravascular aumenta o relaxamento de corpos cavernosos.....	40
5.3 Efeito da hemólise intravascular na expressão proteica de PDE5 e heme oxigenase-1 em corpo cavernoso de camundongo	41
5.4 Inibidor da heme oxigenase corrige aumento do relaxamento do corpo cavernoso do camundongo PHZ.....	41
5.5 Efeito da hemólise intravascular na expressão proteica de N3ADPH subunidade oxidase NOX-2 e marcadores de estresse oxidativo.....	43
5.6 Efeito da hemólise intravascular nos níveis de GMPc em corpo cavernoso de camundongos	44
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	56

1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma das formas mais graves da doença falciforme (DF), que engloba diversas hemoglobinopatias resultantes de uma mutação genética que altera a estrutura da molécula transportadora de oxigênio, a hemoglobina (Kato et al., 2018). Trata-se de uma condição autossômica recessiva que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente em regiões da África, onde a prevalência é alta. Estima-se que mais de meio milhão de bebês tenham nascido com AF em 2021, sendo que três quartos desses casos ocorreram em países africanos (Nkya et al., 2024; Thomson et al., 2023). A fisiopatologia da AF envolve a substituição de um único aminoácido na cadeia β da hemoglobina, onde o ácido glutâmico é substituído por valina, resultando na formação da hemoglobina S (HbS) (Sundd; Gladwin; Novelli, 2019). Sob condições de baixa oxigenação, a HbS polimeriza-se, tornando as hemácias rígidas e em formato de foice, o que leva a crises vaso-oclusivas e danos teciduais. Além disso, a hemólise intravascular crônica é uma alteração importante que contribui significativamente com a fisiopatologia da AF (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017).

A hemólise intravascular resulta na liberação de hemoglobina livre no plasma (Reiter et al., 2002). Em condições fisiológicas, a haptoglobina é a proteína plasmática responsável por defender o organismo contra o acúmulo de hemoglobina livre no plasma (Schaer et al., 2014). No plasma, a haptoglobina se liga à hemoglobina livre e esse complexo é metabolizado por macrófagos no sistema reticuloendotelial, principalmente no baço (Thomsen et al., 2013). Contudo, na AF, elevadas concentrações de hemoglobina são liberadas no plasma, saturando a capacidade de ligação da haptoglobina, cujos níveis declinam rapidamente, resultando no acúmulo de hemoglobina livre e heme no plasma (Gbotosho; Kapetanaki; Kato, 2021; Muller-Eberhard et al., 1968). Para neutralizar a toxicidade decorrente da hemólise, o grupo heme é metabolizado por duas enzimas: a heme oxigenase-1 induzível (HO-1) e a heme oxigenase-2 constitutiva (HO-2). Esse processo produz CO, biliverdina e ferro, reduzindo os efeitos nocivos da hemólise (Thomsen et al., 2013).

Estudos clínicos demonstraram uma forte correlação positiva entre o priapismo e altos níveis de hemólise intravascular em homens com AF (Akakpo; Burnett, 2025; Cita et al., 2016; De Niro et al., 2023; Kato; Steinberg; Gladwin, 2017; Nolan et al., 2005). O priapismo isquêmico é uma condição médica caracterizada por uma ereção prolongada e frequentemente dolorosa do pênis que tipicamente dura mais de quatro horas, independentemente de estimulação sexual (Salonia et al., 2014). Essa condição é uma emergência urológica que pode levar à necrose

peniana e disfunção erétil permanente (Salonia et al., 2014). Pesquisas abrangendo homens adultos com AF indicam uma prevalência de priapismo de 32,6%, com a maioria (74%) experimentando episódios intermitentes, geralmente resolvendo-se espontaneamente dentro de quatro horas (Idris et al., 2020; Idris; Burnett; DeBaun, 2022a).

Nas últimas décadas, diversos estudos experimentais mostraram que o desenvolvimento do priapismo na AF está associado à redução da biodisponibilidade endotelial de óxido nítrico (NO) no pênis (Burnett; Bivalacqua, 2007; Henrique Silva et al., 2018; Idris; Burnett; DeBaun, 2022a; Silva et al., 2016a, 2016c), pois na AF a hemoglobina livre no plasma ou no espaço intersticial pode reagir com o NO, gerando nitrato (NO_3^-) e meta-hemoglobina (Reiter et al., 2002). Estudos clínicos têm especulado que a inativação do NO pela hemoglobina pode contribuir para o priapismo na AF (Nolan et al., 2005; Kato et al., 2006; Cita et al., 2016). Contudo, até o momento, não há estudos experimentais que corroborem essa evidência clínica. Compreender os mecanismos fisiopatológicos que contribuem para o priapismo é importante para prevenir complicações futuras e desenvolver medicamentos para seu tratamento. Considerando que evidências clínicas indicam uma associação entre hemólise intravascular e priapismo, propusemos a hipótese de que o excesso de hemoglobina plasmática contribui para modificações no pênis associadas ao desenvolvimento do priapismo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia Peniana

A genitália externa, no sexo masculino, é composta pelo escroto e o pênis que apresentam seu desenvolvimento na vida intra uterina, sob a influência hormônios androgênicos, a partir da 7ª semana de, sendo completada por volta da 16ª e a 17ª semana gestacional (Graaff, 2003; Yiee; Baskin, 2010).

O pênis, que na posição anatômica está ereto, e quando está flácido sua face dorsal está voltada anteriormente, é um órgão comum aos sistemas genital masculino e urinário, e pode ser dividido da seguinte forma: uma porção proximal fixa aos ramos isquiopúbicos, a raiz do pênis; uma porção média e pendular alongada, o corpo do pênis; e uma porção distal em forma de cone, a glândula do pênis (Graaff, 2003; Hsieh et al., 2012; OVALLE, 2014; Yiee; Baskin, 2010).

O pênis humano é uma estrutura única composta de 3 colunas cilíndricas de tecido erétil mantidas juntas por tecido fibroso e recobertas pela derme e epiderme. Estas colunas cilíndricas, que na raiz do pênis estão firmemente fixadas a membrana do períneo por fâscias e músculos, em seu corpo são formadas dorsalmente pelos corpos cavernosos, e ventralmente pelo corpo esponjoso, sendo que este último abriga a parte esponjosa da uretra. Os corpos cavernosos são revestidos por uma camada fibroelástica densa, denominada túnica albugínea dos corpos cavernosos, e o corpo esponjoso é revestido pela túnica albugínea do corpo esponjoso, um tecido fibroelástico delgado que apresenta uma camada de músculo liso na superfície interna. Diferentemente dos corpos cavernosos, o corpo esponjoso e a glândula do pênis não atingem estado de rigidez, o que justifica as diferenças nos revestimentos fibroelásticos destas estruturas, além evitar a obstrução da uretra durante a ereção peniana (figura 01) (Bivalacqua et al., 2009; OVALLE, 2014; Pászty et al., 1997; Wu et al., 2006).

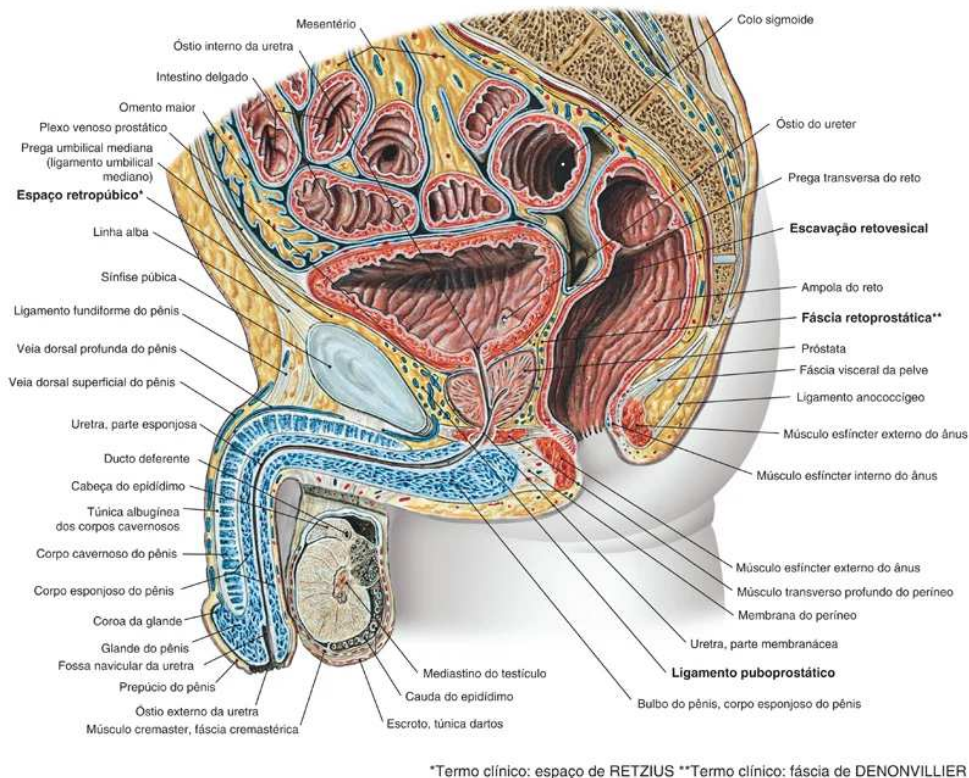


FIGURA 1 – Secção mediana, vista lado esquerdo da pelve masculina. (PAULSEN, Friedrich, 2019).

Os corpos cavernosos ficam unidos no plano mediano do corpo do pênis e formam o septo do pênis, porém na raiz do pênis se separam para formar os ramos do pênis. Além das túnicas albugíneas, as três colunas cilíndricas possuem dois outros revestimentos: a fásia profunda do pênis (fásia de Buck) e a tela subcutânea do pênis (túnica Dartos do pênis) (OVALLE, 2014).

A fásia profunda do pênis, que é a continuação da fásia profunda do períneo, forma um revestimento membranáceo forte que une os corpos cavernosos e corpo esponjoso. Na face anterior da sínfise púbica, na junção da raiz e do corpo do pênis, suas fibras se condensam e formam o ligamento suspensor do pênis, que fixam os corpos eréteis à sínfise púbica (Graaff, 2003).

A tela subcutânea do pênis (túnica Dartos) que se dispõe longitudinalmente ao longo do pênis, na altura da linha alba e sínfise púbica, sofre uma condensação irregular de suas fibras colágenas e elásticas formando o ligamento fundiforme do pênis. Este ligamento, localizado superficialmente ao ligamento suspensor do pênis, se divide na face dorsal do pênis e o

circunda, sendo que em sua face ventral volta a se fundir com a tela subcutânea para formar o septo do escroto (Graaff, 2003; Yiee; Baskin, 2010).

Na raiz do pênis, localizado no espaço superficial do períneo, encontram-se os seguintes músculos: isquiocavernosos, bulboesponjoso e transverso superficial do períneo. Os músculos isquiocavernosos, que estão localizados circundando superficialmente a fáscia profunda que envolve os ramos do pênis, se fundem a membrana do períneo e auxiliam na fixação dos tecidos eréteis. Estes músculos forçam a passagem do sangue dos ramos do pênis para as partes distais dos corpos cavernosos, aumentando o turgor do pênis durante a ereção. A contração destes músculos também comprime as tributárias da veia dorsal profunda do pênis, dificultando a saída de sangue venoso, o que ajuda a manter a ereção e a rigidez peniana (Dean; Lue, 2005; MacDonald; Burnett, 2021).

O músculo bulboesponjoso, que está localizado circundando superficialmente a fáscia profunda que envolve o bulbo do pênis, também se funde a membrana do períneo e auxilia na fixação dos tecidos eréteis nesta região. Este músculo forma um constritor que comprime o bulbo do pênis e a parte proximal do corpo esponjoso, auxiliando no esvaziamento da urina e/ou sêmen residual da parte esponjosa da uretra, aumentando a pressão sobre o tecido erétil na raiz do pênis. Já os músculos transversos superficiais do períneo, em conjunto com o músculo bulboesponjoso, unem-se ao músculo esfíncter externo do ânus na fixação central ao corpo do períneo. A contração simultânea destes músculos durante a ereção do pênis garante uma base mais firme, além de auxiliar na sustentação das vísceras pélvicas. Envolvendo superficialmente estes músculos encontramos a fáscia superficial do períneo (Fáscia de Gallaudet), firmemente fixada aos ramos isquiopúbicos, que se funde anteriormente ao ligamento suspensor do pênis, sendo contínua com a fáscia dos músculos sobre os músculos da parede ântero-lateral do abdome (Graaff, 2003; OVALLE, 2014).

As porções distais dos corpos cavernosos são encobertos pela glândula do pênis, que é uma expansão do corpo esponjoso. A margem livre da glândula do pênis se projeta para formar a coroa da glândula, que decai sobre uma constrição sulcada oblíqua denominada colo da glândula do pênis, separando a glândula do corpo do pênis. Na extremidade da glândula do pênis encontramos uma abertura em fenda, o óstio externo da uretra (Graaff, 2003; OVALLE, 2014).

Todos esses tecidos são revestidos por uma pele fina, de pigmentação um pouco mais escura em relação à pele adjacente, que está unida às fáscias por tecido conjuntivo frouxo. No colo da glândula, a pele e a fáscia do pênis são prolongados como uma dupla camada de pele formando o prepúcio do pênis, que em homens não circuncidados cobre a glândula do pênis. Da

face uretral da glândula do pênis até a camada mais profunda do prepúcio, observa-se uma prega mediana denominada de frênulo do prepúcio (OVALLE, 2014).

2.2. Inervação Peniana

A inervação peniana se dá através dos nervos formados pelos segmentos medulares de S2–S4 da medula espinal e dos gânglios sensitivos de nervos espinais, através dos nervos esplâncnicos pélvicos para a inervação parassimpática, plexo hipogástrico superior para a inervação simpática, e dos nervos pudendos para a inervação somática (Drake; Vogl; Mitchell, 2021; Moore; Dalley; Agur, 2018; Yiee; Baskin, 2010).

A inervação sensitiva e motora somática do períneo é realizada por ramos do nervo pudendo, que penetra na fossa isquioanal pelo forame isquiático menor e segue até o espaço superficial do períneo pelo canal do pudendo (Canal de Alcock). Três são os principais ramos do nervo pudendo: nervo anal inferior, nervo perineal e nervo dorsal do pênis. O nervo anal inferior inerva os músculos esfíncter anal externo, o revestimento da parte inferior do canal anal e a pele da região perianal. O nervo perineal, maior ramo inferior do nervo pudendo, localizado superficialmente a membrana do períneo, através de seus ramos musculares supre os músculos superficiais e profundos do períneo, a parte anterior do músculo esfíncter externo do ânus e dos músculos levantadores do ânus, já seus ramos escrotais, através dos nervos escrotais posteriores, suprem a pele do escroto. O nervo dorsal do pênis, principal nervo sensitivo do órgão genital masculino, perfura a membrana do períneo e segue anteriormente no espaço profundo do períneo e lateralmente a artéria dorsal do pênis, suprindo em seu trajeto sobre o dorso do pênis os corpos cavernosos e termina na glândula do pênis (Drake; Vogl; Mitchell, 2021; Moore; Dalley; Agur, 2018).

A inervação autonômica do pênis se dá pelos ramos no plexo hipogástrico inferior, que possui inervação autonômica mista, com fibras simpáticas e parassimpáticas. Este plexo é formado pela junção do plexo hipogástrico superior, que na altura do promontório do osso sacro formam os nervos hipogástricos (direito e esquerdo) que conduzem fibras pós-ganglionares simpáticas, e pelos nervos esplâncnicos pélvicos, que conduzem fibras pós-ganglionares parassimpáticas sacrais (Drake; Vogl; Mitchell, 2021; Moore; Dalley; Agur, 2018).

O plexo hipogástrico superior está localizado na fáscia extraperitoneal da pelve, lateralmente ao reto, glândula seminal, parte posterior da bexiga urinária e próstata. Na próstata

forma o plexo prostático, composto por grandes nervos que penetram na base e faces laterais deste órgão, suprindo além da próstata, as glândulas seminais, a uretra, os ductos ejaculatórios, os corpos cavernosos e corpo esponjoso e glândulas bulbouretrais. Os nervos para os corpos cavernosos foram dois conjuntos principais de nervos: os nervos cavernosos menor e maior. Os nervos cavernosos menores suprem o corpo esponjoso e a parte esponjosa da uretra masculina, já os nervos cavernosos maiores, seguem no dorso do pênis em conjunto com o nervo dorsal e suprem principalmente os corpos cavernosos. Desta forma, como a inervação autonômica é mista, a via simpática promove a contração da próstata, do músculo esfíncter da uretra e a vasoconstrição peniana, enquanto a via parassimpática promove a vasodilatação, já que estes nervos inervam as artérias helicinas do tecido erétil (Moore; Dalley; Agur, 2018).

2.3. Vascularização peniana

A irrigação arterial peniana é realizada por um ramo da divisão anterior da artéria ilíaca interna, a artéria pudenda interna, que juntamente com o nervo pudendo e veia pudenda interna, penetra na fossa isquioanal pelo forame isquiático menor e segue até o espaço superficial do períneo pelo canal do pudendo (Canal de Alcock). Superficialmente à membrana do períneo, este vaso emite as artérias perineais que suprem os músculos do espaço superficial do períneo e o escroto. Logo após, para alcançar o espaço profundo do períneo, a artéria pudenda interna perfura a membrana do períneo e emite ramos os seguintes vasos: artéria do bulbo do pênis, artéria uretral, artéria profunda do pênis e a artéria dorsal do pênis (Moore; Dalley; Agur, 2018).

A artéria do bulbo do pênis irriga o bulbo do pênis, a parte esponjosa da uretra na raiz do pênis e a glândula bulbouretral. A artéria uretral irriga a uretra e o tecido erétil ao seu redor e se dirige a glândula do pênis. A artéria profunda do pênis, ramo terminal da artéria pudenda interna, perfura novamente a membrana do períneo e para penetrar nos ramos do pênis e continua nos corpos cavernosos suprindo a totalidade deste tecido erétil. Dentro das cavernas formadas pelas trabéculas dos corpos cavernosos, estes vasos se ramificam e formam as artérias helicinas do pênis (Moore; Dalley; Agur, 2018; Reis, 2012).

Estes vasos são de suma importância para a ereção peniana, pois quando ocorre uma vasodilatação estes vasos perdem a sua tortuosidade, diminuem a resistência ao fluxo

sanguíneo, garantindo assim um maior fluxo sanguíneo para os tecidos eréteis. Porém quando o pênis está flácido, estas artérias helicinas do pênis se mantêm espiraladas, restringindo o fluxo sanguíneo local. Além disso, os ramos superficiais e profundos das artérias pudendas externas irrigam a pele do pênis, anastomosando-se com ramos das artérias pudendas internas (Moore; Dalley; Agur, 2018).

A artéria dorsal do pênis, outro ramo terminal da artéria pudenda interna, segue no espaço profundo do períneo, perfura novamente a membrana do períneo e se dirige superiormente entre o ramos do pênis e a sínfise púbica atravessando o ligamento suspensor do pênis para seguir ao longo do dorso do pênis em direção a glânde, onde se bifurca em ramos para suprir esta região e o prepúcio do pênis, suprimindo assim a pele do pênis, a bainha fibrosa dos corpos cavernosos, a região distal do corpo esponjoso do pênis e a parte esponjosa da uretra (Dean; Lue, 2005; Drake; Vogl; Mitchell, 2021).

A drenagem venosa peniana pode ser dividida em profunda e superficial, sendo que geralmente as veias do períneo acompanham as artérias de mesmo nome, e unem-se às veias pudendas internas, que se conectam na cavidade pélvica à veia ilíaca interna. A exceção é a veia dorsal profunda do pênis, que drena principalmente a glânde e os corpos cavernosos (drenagem profunda). A veia dorsal profunda cursa ao longo da linha mediana, entre as artérias dorsais a cada lado do corpo do pênis, atravessa o espaço entre o ligamento púbico inferior e a região profunda do períneo, e se conecta ao plexo de veias ao redor da próstata. O destaque principal é a drenagem venosa dos corpos cavernosos que ocorre através das veias subtúnicas, as quais são comprimidas contra a túnica albugínea durante a ereção, caracterizando o mecanismo oclusivo venoso, sendo o mesmo essencial para uma ereção completa (Moore; Dalley; Agur, 2018; Reis, 2012). O sangue da pele e tela subcutânea (drenagem superficial) é drenado para as veias dorsais superficiais, que drenam para veias pudendas externas e posteriormente é drenado para veia safena magna e desta para a veia femoral (Moore; Dalley; Agur, 2018).

2.4. Hemodinâmica Peniana

A ereção peniana é um evento hemodinâmico no pênis, sendo o resultado final do relaxamento dos tecidos cavernosos que envolve tanto o sistema nervoso central, o sistema nerurovegetativo, quanto os fatores locais (Mizusawa; Ishizuka; Nishizawa, 2002; Simonsen;

García-Sacristán; Prieto, 2002). A ativação da porção parassimpática do sistema neurovegetativo inicia o mecanismo da ereção peniana, pois determina a vasodilatação da artéria peniana e o relaxamento dos elementos musculares lisos eréteis dos corpos cavernosos, permitindo um maior aporte sanguíneo arterial a estas estruturas (Simonsen; García-Sacristán; Prieto, 2002)

Os eventos hemodinâmicos da fase de ereção podem ser divididos em cinco etapas. Na fase 1, ocorre um aumento rápido do fluxo sanguíneo no corpo cavernoso, devido a vasodilatação da artéria peniana, com alteração significativa da pressão intracorporal peniana de 11 mmHg para 25 mmHg. Na fase 2, é caracterizada pelo aumento da pressão intracavernosa de 25 mmHg para 40 mmHg o que acaba determinando uma diminuição nos picos de velocidade sistólica e velocidade final diastólica se tona zero, sendo este valor indicativo do início da fase 3, mas nesta fase, o evento determinante para ereção é o mecanismo oclusivo venoso, que ocorre devido ao entumescimento local, levando a oclusão do plexo venoso subtúnico contra a túnica albugínea e consequente redução da drenagem sanguínea. Na fase 4, a pressão intracavernosa é maior que a pressão diastólica. Na fase 5, observa-se um aumento na pressão sistólica para cerca 90 mmHg e pressão intracavernosa para cerca de 100mmHg, que eleva o pênis da posição dependente para o estado ereto (fase de ereção completa) e aumento ainda maior da pressão intracavernosa com contração dos músculos isquiocavernosos (fase de ereção rígida) (Dean; Lue, 2005).

Após a fase de ereção peniana, inicia-se a fase de detumescência, sendo esta, iniciada pelo relaxamento do músculo isquiocavernoso e dividida em três etapas. A primeira implica um aumento transitório da pressão intracorpórea, indicando o início da contração do músculo liso contra um sistema venoso fechado. A segunda fase mostra uma diminuição lenta da pressão, sugerindo uma reabertura lenta dos canais venosos com retomada do nível basal do fluxo arterial. A terceira fase mostra uma rápida diminuição da pressão com capacidade de fluxo venoso totalmente restaurada (Dean; Lue, 2005).

2.5. Papel do NO no Relaxamento de Corpos Cavernoso e Ereção Peniana

A fisiologia éretil normal está relacionada com a via do NO-GMPc (Hurt et al., 2012; Ignarro, 1990; Shamloul, 2009). A ativação da resposta éretil envolve mecanismos vasculares e neurogênicos, regulados principalmente pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável

pela produção de NO. As isoformas constitutivas dessa enzima, a NOS neuronal (nNOS), presente nos terminais nitrérgicos, e a NOS endotelial (eNOS), localizada no endotélio vascular e sinusoidal, controlam, respectivamente, as fases inicial e de manutenção da ereção peniana (Hurt et al., 2012). Após serem ativadas, essas enzimas produzem NO a partir do aminoácido L-arginina (Hurt et al., 2012). O NO difunde-se para as células musculares lisas adjacentes, onde se liga ao grupo heme da guanilato ciclase solúvel (GCs), ativando-a para converter guanosina-5'-trifosfato (GTP) em Monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Champion et al., 2005). O aumento nos níveis de GMPc ativa a proteína quinase G (PKG), que promove o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso ao desencadear uma série de eventos moleculares que culminam na diminuição da concentração de cálcio intracelular. Essa redução do cálcio resulta no relaxamento das células musculares lisas e, conseqüentemente, na ereção peniana, como demonstrado na figura 2 (Champion et al., 2005; Hurt et al., 2012).

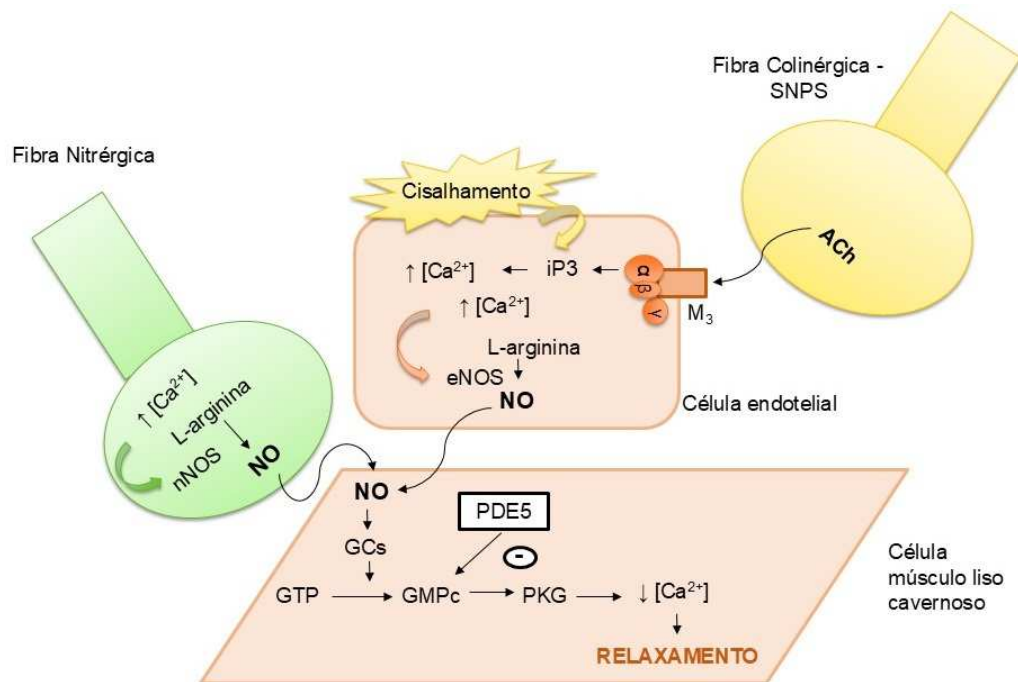


FIGURA 2 - Via de relaxamento do músculo liso cavernoso. IP₃, trifosfato de Inositol; Ca²⁺, Cálcio; NO, Óxido nítrico; eNOS, Óxido nítrico sintase endotelial; nNOS, Óxido nítrico sintase neuronal; PDE5, Fosfodiesterase 5.

O término do processo erétil é determinado pela noradrenalina, liberada pelas terminações nervosas do sistema nervoso simpático. Sua ação promove a contração do corpo cavernoso por meio da ativação de receptores adrenérgicos α_1 localizados pós-juncionalmente

e acoplados à proteína Gq. Essa ativação estimula a enzima fosfolipase C, que, por sua vez, catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato em trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG), culminando no aumento das concentrações intracelulares de cálcio. O cálcio, ao se ligar à calmodulina, ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), promovendo a fosforilação da MLC. A MLC fosforilada interage com a beta-actina, desencadeando a contração do músculo liso e contribuindo para a manutenção do estado flácido peniano (Andersson, 2011; Mitidieri et al., 2020).

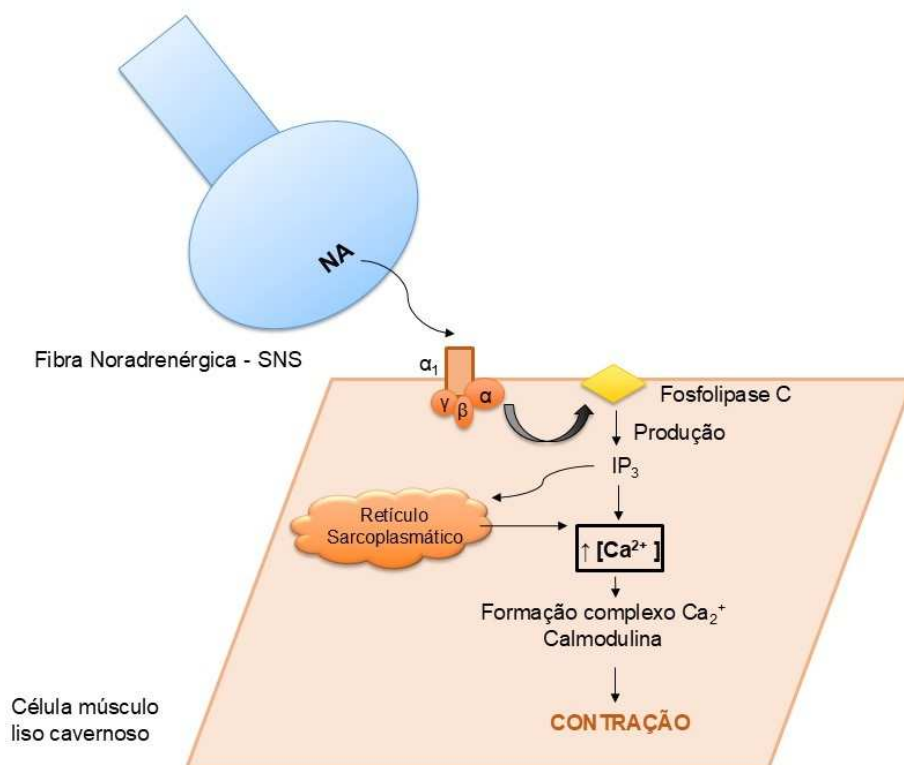


FIGURA 3 – Via de contração do músculo liso cavernoso. IP₃, trifosfato de Inositol; Ca²⁺, Cálcio; NA, Noradrenalina; SNS, sistema nervoso simpático.

Além dos eventos descritos anteriormente o término do processo erétil também é mediado pela fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), enzima que hidrolisa o GMPc, convertendo-o em 5'-GMP inativo. O equilíbrio entre a atividade da GCs e da PDE5 é crucial para manter os níveis adequados de GMPc e, assim, a homeostase neurovascular peniana (ANELE; MORRISON; BURNETT, 2015; CORBIN et al., 2000), tendo em vista que o GMPc, cuja produção é

estimulada pelo NO, exerce também um papel regulador sobre a expressão da fosfodiesterase PDE-5. Essa enzima representa um elemento importante no processo de detumescência, atuando na degradação do GMPc. Observa-se, ainda, que os níveis de expressão da PDE-5 apresentam uma correlação direta com a concentração basal de cGMP nos tecidos (Idris; Burnett; DeBaun, 2022b) (Figura 3).

2.6. Anemia Falciforme e priapismo

A DF é um termo utilizado para abranger diferentes hemoglobinopatias resultantes de uma mutação genética que altera a morfologia da hemoglobina (Kato et al., 2018). A forma mais comum e grave de DF é a anemia falciforme (AF) (Ware et al., 2017), caracterizada por ser uma doença genética autossômica recessiva, sendo AF um termo genérico dado à todas as mutações no gene da globina beta que compartilham a mesma síndrome clínica (Sundd; Gladwin; Novelli, 2019). A relevância da AF para a saúde pública tem crescido, com mais de meio milhão de bebês nascendo anualmente com AF em países da Africanos (Nkya et al., 2024). A mortalidade total por anemia falciforme tem consistentemente figurado entre as 20 principais causas de morte entre crianças menores de 5 anos, crianças de 5 a 14 anos e indivíduos de 15 a 49 anos em mais da metade das regiões de alta prevalência (Thomson et al., 2023).

Além do impacto da mortalidade atribuída a AF, a mutação sofrida pela hemoglobina faz com que a hemácia assuma um formato crescente ou de foice e isso implica em consequências clínicas importantes (Kato et al., 2018; Monteiro et al., 2015; Rees; Williams; Gladwin, 2010). Essas complicações incluem crise vaso-oclusiva dolorosa, acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda, hemorragia retiniana, necrose avascular, infecções, infarto esplênico, entre outras e complicações tardias, como hipertensão pulmonar, úlceras de perna, priapismo e disfunção erétil decorrente do priapismo (Rees; Williams; Gladwin, 2010; Wood; Hsu; Gladwin, 2008).

A base molecular da AF é uma mutação pontual que resulta na substituição do ácido glutâmico por valina na cadeia β da hemoglobina. Essa troca, causada pela alteração da base nitrogenada timina por adenina (GAT $\rightarrow$ GTT) no sexto códon do éxon 1 do DNA localizado no cromossomo 11. Essa mutação altera o DNA de maneira que, em vez de codificar o ácido glutâmico, passa a codificar a valina. Essa valina é então incorporada na posição 6 da sequência de aminoácidos da cadeia β da hemoglobina, resultando em uma modificação em

sua estrutura molecular, formando a hemoglobina HbS. A falcização das hemácias ocorre quando as mesmas, sob certas condições, como baixa tensão de oxigênio ou desidratação, a HbS sofre polimerização, formando polímeros longos (forma de foice), rígidos dentro dos glóbulos vermelhos, tornando estes mais suscetíveis à hemólise. Devido à sua rigidez, elas não fluem facilmente pelos vasos sanguíneos, o que pode resultar em vaso-occlusão e isquemia tecidual (Elendu et al., 2023; Migotsky; Beestrum; Badawy, 2022).

Assim, a anemia falciforme não resulta apenas em complicações clínicas imediatas e potencialmente fatais, mas também apresenta um impacto duradouro na qualidade de vida dos indivíduos afetados, exigindo um manejo clínico complexo para prevenir e tratar suas múltiplas manifestações (Ahuja et al., 2021; Kato; Steinberg; Gladwin, 2017).

O priapismo, uma ereção dolorosa persistente que ocorre com ou sem desejo sexual, está relacionado à AF (Alvaia et al., 2020; Idris et al., 2020). Pacientes com histórico de priapismo associado à doença falciforme tendem a apresentar maior incidência de alterações morfofuncionais penianas, acompanhadas por níveis reduzidos de desejo sexual, menor satisfação durante a atividade sexual e percepção global negativa em relação à vida sexual, quando comparados àqueles sem episódios prévios de priapismo. Além disso, observa-se que a prevalência de disfunção erétil severa é aproximadamente 2,5 vezes mais elevada entre indivíduos com anemia falciforme em relação à população masculina sem a doença, aumentando para cerca de cinco vezes em pacientes que já vivenciaram episódios de priapismo (Hudnall; Reed-Maldonado; Lue, 2017; Idris et al., 2020).

Uma constatação relevante apresentada por Idris e colaboradores (2020) revela que aproximadamente 50% dos homens acometidos por priapismo secundário à anemia falciforme jamais buscaram assistência médica para essa complicação. Tal evidência sugere que a carga real do priapismo pode estar significativamente subestimada na literatura científica. Embora os dados do referido estudo não tenham permitido identificar as causas específicas para a ausência de procura por atendimento, outras investigações apontam fatores como desconhecimento da associação entre priapismo e a doença falciforme, sentimentos de vergonha diante da condição e a natureza autolimitada das crises de priapismo do tipo intermitente. Diante desse cenário, torna-se imprescindível a implementação de estratégias de comunicação mais eficazes e de campanhas educativas voltadas à promoção da saúde, com vistas a fomentar mudanças comportamentais positivas no padrão de busca por cuidados médicos por parte desses pacientes (Alvaia et al., 2020; Idris et al., 2020; Whyte; Morrison-Blidgen; Asnani, 2021).

2.7. Anemia Falciforme e Hemólise intravascular

A hemoglobina é a proteína presente nos eritrócitos, cuja função principal é transportar oxigênio por todo o organismo (Ahmed; Ghatge; Safo, 2020). Estruturalmente, é uma proteína globular esferoide composta por quatro subunidades, divididas em dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas. Um par é formado pelas cadeias do tipo alfa (alfa- α e zeta- ξ) e o outro pelas cadeias do tipo beta (beta- β , delta- δ , gama- γ e epsilon- ϵ). Quimicamente, essas subunidades estão ligadas a um núcleo prostético de ferro, a ferroprotoporfirina IX (heme), que possui a capacidade de captar oxigênio na circulação pulmonar e liberar esta molécula nos tecidos periféricos. Cada cadeia polipeptídica da globina é composta por uma sequência específica de aminoácidos: as cadeias alfas têm 141 aminoácidos, enquanto as cadeias betas têm 146. As diferentes combinações dessas cadeias resultam nas várias formas de hemoglobina presentes nos eritrócitos desde o período embrionário até a fase adulta, sendo produzidas ao longo das diversas etapas do desenvolvimento humano (Figura 4) (Sundd; Gladwin; Novelli, 2019).

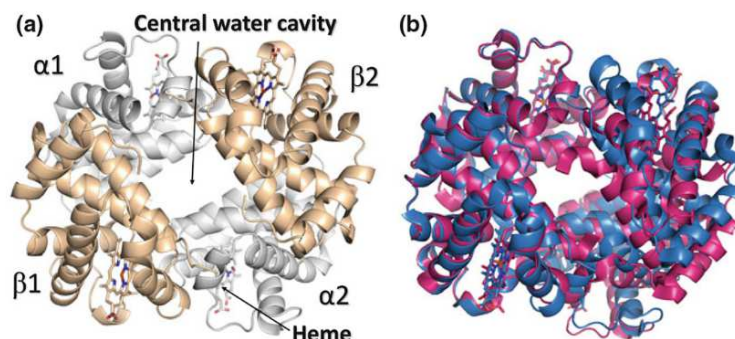


FIGURA 4 - Estrutura quaternária geral da Hb. (a) duas cadeias alfa e beta coloridas em cinza e bege, respectivamente. (b) Estrutura da Hb oxigenada (estado R) (magenta) sobreposta à estrutura da Hb desoxigenada (estado T) (azul). (Adaptado de Ahmed; Ghatge; Safo, 2020).

Na AF, ocorre uma mutação na cadeia beta da hemoglobina, levando à formação da HbS. Após a desoxigenação, as moléculas mutadas de HbS polimerizam e formam fibras rígidas (Gutierrez et al., 2021). Esses polímeros de hemoglobina causam deformações nos eritrócitos, levando à sua falcização, o que compromete a reologia sanguínea e favorece a agregação de eritrócitos falciformes com neutrófilos, plaquetas e células endoteliais. Esse processo promove

a estase do fluxo sanguíneo, conhecida como vaso-oclusão, que desencadeia lesões por isquemia-reperfusão (Belcher et al., 2010; Solovey et al., 2004; Sundd; Gladwin; Novelli, 2019). Além disso, os polímeros de HbS tornam as membranas dos eritrócitos mais frágeis, favorecendo a hemólise intravascular, caracterizada pela destruição das hemácias na circulação e liberação de seu conteúdo no plasma (Reiter et al., 2002; Russo et al., 2025).

A liberação de grandes quantidades de hemoglobina livre na corrente sanguínea é uma complicação significativa da hemólise intravascular, resultando na formação de metabólitos nocivos, como o heme livre. O organismo possui mecanismos protetores para limitar a toxicidade dessas moléculas, tais como a ligação da hemoglobina livre à haptoglobina e do heme livre à hemopexina, além da degradação enzimática mediada pela HO-1 (Gbotosho; Kapetanaki; Kato, 2021).

Quando os eritrócitos sofrem lise no sistema vascular e a hemoglobina é liberada no plasma, ela se dimeriza e é prontamente capturada pela haptoglobina, uma proteína sérica (Nagel; Gibson, 1971). O complexo haptoglobina-hemoglobina desempenha um papel crucial no transporte da hemoglobina para as células do sistema mononuclear fagocitário, facilitando a recuperação do íon ferro durante o processo de hemocaterese e prevenindo seus efeitos tóxicos (Shih; McFarlane; Verhovsek, 2014). Esse complexo é reconhecido pelo receptor CD163 na superfície de monócitos e macrófagos, que se liga a ele com alta afinidade, facilitando sua endocitose e subsequente degradação em tecidos como fígado, gânglios linfáticos, medula óssea e pulmão. A hemoglobina é então degradada em heme e globina; o anel heme é aberto, produzindo ferro livre e biliverdina, que é reduzida a bilirrubina pela enzima biliverdina redutase (Kristiansen et al., 2001; Smith; McCulloh, 2015; Thomsen et al., 2013).

Na AF, ocorre uma diminuição significativa dos níveis séricos de haptoglobina devido ao fato de que essa proteína não é reciclada após a formação do complexo haptoglobina-hemoglobina (Buehler; Humar; Schaer, 2020). Devido à intensa hemólise presente na doença, há uma formação excessiva desse complexo, resultando em esgotamento da haptoglobina e consequente acúmulo de hemoglobina livre no plasma (Kristiansen et al., 2001). Além disso, há esgotamento dos níveis séricos de hemopexina devido ao aumento de heme livre (Kristiansen et al., 2001; Smith; McCulloh, 2015).

2.8. Papel da Heme Oxigenase na Hemólise Intravascular

A heme oxigenase-1 (HO-1) desempenha um papel central na resposta adaptativa ao estresse oxidativo induzido pela hemólise intravascular, sendo fundamental para a degradação do heme livre e a proteção contra danos teciduais. A HO é uma enzima metabólica e proteína de estresse que existe em duas isoformas expressas em humanos: a HO-1, principal isoenzima induzível, regulada positivamente quando exposta ao heme da hemoglobina, e a HO-2, isoenzima constitutiva (Shamloul, 2009; Thomsen et al., 2013). A HO-1, a principal isoenzima induzível e regulada positivamente quando exposta ao heme da hemoglobina, e sua isoenzima constitutivamente regulada, HO-2. A HO-1 converte o heme em três produtos catabólicos: biliverdina-IX α (BV), ferro ferroso e CO (Belcher et al., 2010).

Em situações de hemólise, a quantidade de hemoglobina e heme liberada na corrente sanguínea pode ultrapassar a capacidade dos mecanismos fisiológicos de depuração, como os mediadores haptoglobina e hemopexina, resultando na elevação dos níveis de heme livre com propriedades citotóxicas, pró-oxidantes e pró-inflamatórias. Nesse contexto, a heme oxigenase-1 (HO-1) atua de forma crucial, degradando o heme e desempenhando um papel protetor ao reduzir o estresse oxidativo e a resposta inflamatória decorrentes da hemólise (Menon et al., 2022).

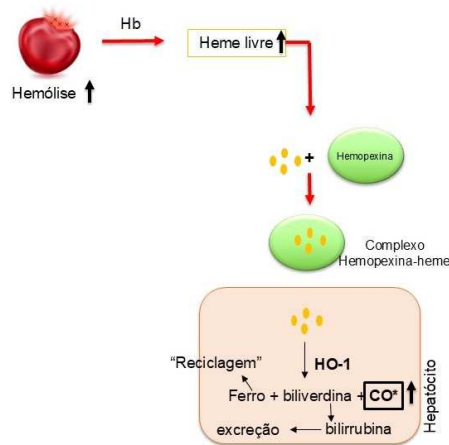


FIGURA 5 - A hemólise intravascular aumenta a ativação da HO-1 com aumento da produção de CO. Hb, Hemoglobina; HO-1, Heme oxigenase – 1; CO, Monóxido de carbono.

O monóxido de carbono (CO), um dos produtos da degradação do heme catalisado pela HO-1, atua como importante sinalizador parácrino nos tecidos vasculares, incluindo o corpo cavernoso peniano. Assim como o NO, o CO ativa a guanilato ciclase solúvel, elevando os níveis de GMPc, o que promove a diminuição do cálcio intracelular e o consequente relaxamento do músculo liso cavernoso. Esse processo é essencial para a vasodilatação e a manutenção da ereção peniana. Em condições como a doença falciforme, onde há estresse oxidativo crônico devido à hemólise contínua, a expressão de HO-1 pode representar um mecanismo compensatório com impacto direto sobre a fisiologia erétil. A literatura recente destaca a relevância da atividade da HO-1 e a consequente produção de CO na regulação do tônus vascular peniano e aponta seu potencial como alvo terapêutico na disfunção erétil associada à hemólise intravascular (Belcher et al., 2010; Choi; Kim, 2022; Ryter; Alam; Choi, 2006a; Shen et al., 2022) (Figura 5).

Essas evidências reforçam a importância da HO-1 não apenas como enzima detoxificante do heme, mas como moduladora crítica da homeostase vascular e sexual masculina, especialmente em contextos patológicos como a anemia falciforme pois desempenha um papel crucial na oxidativa, promovendo a expressão gênica adaptativa e aumentando a circulação sanguínea por meio de processos como vasodilatação e neovascularização (Choi; Kim, 2022).

2.9. Fisiopatologia do Priapismo (NO – GMPc – Heme Oxigenase)

O priapismo pode ser classificado em isquêmico (baixo fluxo veno-oclusivo), não isquêmico (alto fluxo arterial) e recorrente (episódios recorrentes) (Burnett; Bivalacqua, 2007). A forma típica de priapismo de pacientes portadores de anemia falciforme é a isquêmica, sendo a fisiopatologia do priapismo isquêmico relacionada com a congestão venosa, tendo em vista que há aprisionamento sanguíneo nos corpos cavernosos, e consequentemente retenção de sangue venoso e diminuição de fluxo arterial, que causa aumento da pressão parcial de CO₂ e diminuição da pressão parcial de O₂ (Montague et al., 2003). Entretanto, nas últimas décadas diversos estudos mostraram que a fisiopatologia do priapismo na AF é ocasionada por alterações moleculares que ocorrem no pênis.

A disfunção da via do NO-GMPc-PDE5 é a principal alteração que participa para o desenvolvimento do priapismo na AF. A biodisponibilidade do NO derivado do endotélio está cronicamente reduzida: (i) devido a hemólise que libera hemoglobina na circulação sanguínea e

consome o NO (Burnett; Bivalacqua, 2007; Reiter et al., 2002); (ii) atividade e expressão da eNOS reduzida (Champion et al., 2005; Musicki et al., 2018); (iii) aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A redução da atividade da eNOS compromete sua função na síntese de NO, e consequentemente compromete os níveis de atividade da PDE5 também ficam reduzidos (Champion et al., 2005). Normalmente, a estimulação erétil iniciada por impulsos neurológicos resulta no acúmulo de GMPc, promovendo o relaxamento dos corpos cavernosos. Contudo, com a diminuição dos níveis de PDE5, o controle natural da ereção é prejudicado, aumentando o risco de desenvolvimento de priapismo (Anele; Morrison; Burnett, 2015).

Nos últimos anos além da biodisponibilidade do NO, o papel do CO e de sua enzima precursora, a HO-1, na regulação da ereção peniana tem atraído um interesse crescente (MacDonald; Burnett, 2021; Shamloul, 2009). Na AF ocorre a hemólise intravascular, por esse motivo, observa-se a presença de maiores quantidades de heme livre levando a uma maior ativação da HO-1, o resultado deste evento é o aumento na geração de CO (Ryter, 2022). Esse aumento na produção de CO estimula a ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs), o que culmina em um maior relaxamento do corpo cavernoso, facilitando o mecanismo de ereção peniana. Estudos que bloquearam o HO-1 trouxeram uma redução significativa nesse efeito de relaxamento, evidenciando sua importância no mecanismo envolvido no relaxamento do corpo cavernoso (Ushiyama et al., 2004) (Figura 6).

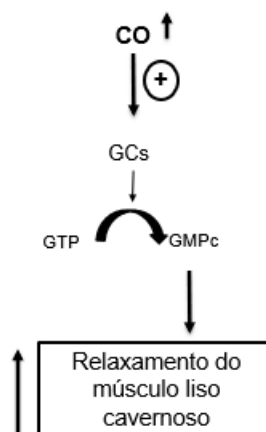


FIGURA 6 - Via CO – GCs –GMPc nos corpos cavernosos. CO, Monóxido de carbono; GCs, Guanilil ciclato solúvel; GTP, Guanosina trifosfato; GMPc, Monofosfato **cíclico de guanosina**.

2.10. Papel do estresse oxidativo na fisiopatologia do priapismo na anemia falciforme

Além dos eventos descritos anteriormente, a AF está relacionada ao aumento do estresse oxidativo, causado pela liberação de heme livre e ferro durante a hemólise (Orrico et al., 2023; Solovey et al., 2004). O estresse oxidativo provoca respostas inflamatórias, ativa as células endoteliais e facilita a adesão das hemácias falciformes ao endotélio vascular. Esse processo inflamatório desencadeia uma cascata que intensifica a vaso-occlusão e a disfunção endotelial que resulta em aumento do relaxamento do corpo cavernoso desenvolvimento do priapismo (Lagoda et al., 2013; Musicki et al., 2012; Musicki; Arthur L. Burnett, 2020; Silva et al., 2016a).

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de (EROs), levando ao acúmulo de moléculas altamente reativas, incluindo o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^-$), que podem causar danos oxidativos em biomoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Sanz; Aldea; Barsan, 2025; Sies; Jones, 2020). A NADPH oxidase, considerada a principal fonte enzimática de ânion superóxido em condições patológicas, é um complexo multiproteico formado por seis subunidades, dentre as quais destaca-se a NOX-2 (Schröder, 2020), uma isoforma catalítica particularmente relevante na fisiopatologia do priapismo associado à AF (Frey; Ushio–Fukai; Malik, 2009; Jin et al., 2008; Koju; Qin; Sheng, 2022; Silva et al., 2016a). Em células endoteliais, a NADPH oxidase é ativada por diversos fatores como citocinas, estresse de cisalhamento, hipóxia e agonistas acoplados à proteína G (Abrashev et al., 2025). Uma vez ativada, a NADPH oxidase catalisa a redução do oxigênio molecular através da transferência de elétrons provenientes do NADPH, resultando na formação do ânion superóxido. Este, por sua vez, pode reagir rapidamente com o NO, formando peroxinitrito, uma espécie reativa de elevada toxicidade celular, capaz de induzir danos oxidativos e comprometer a integridade funcional das células (Möller et al., 2023; Rabêlo et al., 2010; Silva et al., 2016a).

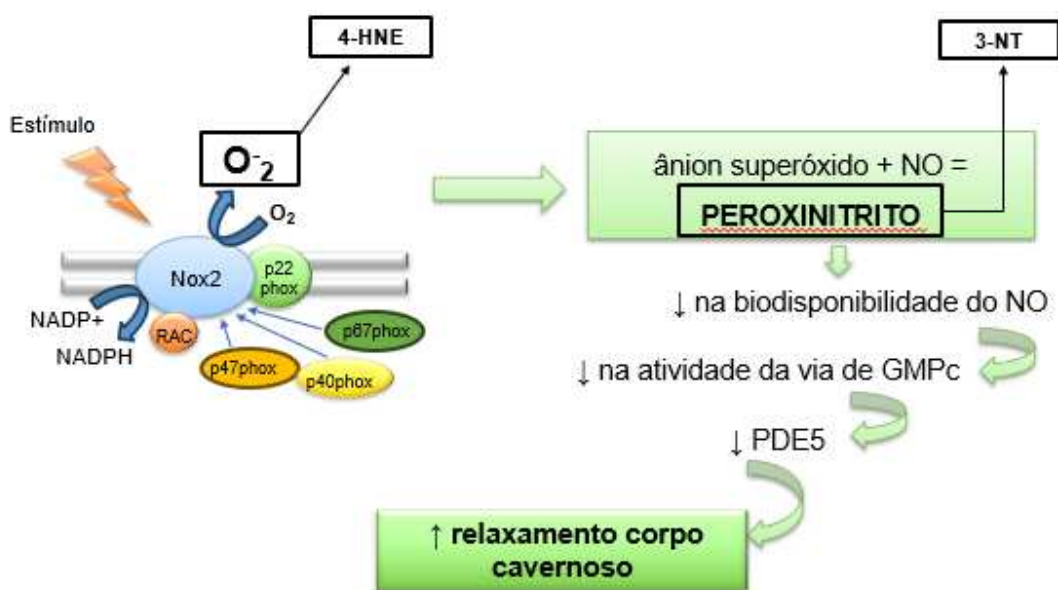


FIGURA 7 – Papel do estresse oxidativo no priapismo na anemia falciforme. O₂⁻, ânion superóxido; 4-HNE, 4-Hidroxinonenal; 3-NT, 3-Nitrotirosina; NO, Óxido nítrico; PDE5, Fosfodiesterase 5; GMPc, Monofosfato cíclico de guanosina; NADP, Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina; NADPH, Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Hidrogênio.

Estudos utilizando camundongos modelos de AF tratados com haptoglobina apresentaram uma redução na expressão de NOX-2 e consequentemente do estresse oxidativo no pênis, onde a expressão de marcadores de estresse oxidativo (4-HNE) e estresse nitrosativo (3-NT) foi diminuída após o tratamento (Pereira et al., 2022). Pesquisas anteriores também mostraram que o NO exógeno inibe a atividade da NADPH oxidase por meio da S-nitrosilação direta da subunidade p47phox em células endoteliais (Selemidis et al., 2007). (Figura 7).

Estudos demonstram que o NO é um potente inibidor da NADPH oxidase, e esta inibição consequentemente reduz a produção de ânion superóxido e todas as complicações associadas ao aumento do estresse oxidativo, incluindo o priapismo (Lagoda et al., 2013; Musicki et al., 2012; Silva et al., 2016a). Em pênis de camundongos com AF, o tratamento com moléculas que aumentam a biodisponibilidade de NO/GMPc, como testosterona, haptoglobina e nitrato de benzila reduziram a expressão de NOX-2, 3-NT e 4-HNE, além de reverter o priapismo (Musicki et al., 2018; Pereira et al., 2022; Silva et al., 2016b).

2.11. Modelo animal de hemólise intravascular

O modelo em camundongo de anemia hemolítica induzido por fenilhidrazina (PHZ) é amplamente descrito na literatura científica, por reproduzir as principais alterações hematológicas observadas nas anemias hemolíticas, como hemólise intravascular acompanhada por aumento da concentração de hemoglobina plasmática livre, hematócrito baixo, baixa concentração de hemoglobina total e aumento de reticulócito (Dutra et al., 2014; Lim et al., 1998; Moreau et al., 2012; Zhang et al., 2013).

A PHZ é utilizada em experimentos para induzir hemólise intravascular devido à sua capacidade de causar intenso estresse oxidativo nos eritrócitos. Essa substância reage com o oxigênio e a hemoglobina presentes nas hemácias, gerando EROs, como o peróxido de hidrogênio, que promovem a oxidação da hemoglobina e a formação de corpos de Heinz (Itano; Hirota; Hosokawa, 1975; Goldstein; Rozen; Kunis, 1980). A PHZ promove a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática, provocando danos estruturais que tornam a membrana celular mais frágil e suscetível à ruptura. Como resultado, os eritrócitos se rompem dentro dos vasos sanguíneos, liberando hemoglobina livre no plasma, caracterizando a hemólise intravascular (Itano; Hirota; Hosokawa, 1975; Goldstein; Rozen; Kunis, 1980). PHZ é um bom modelo para estudar a fase aguda ou hemólise intravascular crônica e foi padronizado em nosso grupo em estudos precursores (Goldstein; Rozen; Kunis, 1980).

3. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da hemólise intravascular induzida pela PHZ no relaxamento da musculatura lisa de corpos cavernosos de camundongos e o papel da hemólise intravascular no estresse oxidativo no pênis.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (I) Avaliar as principais alterações hematológicas promovidas pela administração de PHZ;
- (II) Determinar a expressão proteica das enzimas PDE5 e HO-1 nos corpos cavernosos.
- (III) Investigar os efeitos do inibidor da heme oxigenase no relaxamento dos corpos cavernosos;
- (IV) Avaliar o impacto da hemólise intravascular no estresse oxidativo dos corpos cavernosos.
- (V) Quantificar o efeito da hemólise intravascular nos níveis de GMPc nos corpos cavernosos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e modelo de hemólise intravascular

No presente estudo, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J, com idade entre 3 e 5 meses, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram alojados no Biotério da Universidade São Francisco (USF), mantidos em condições controladas com temperatura de 24°C e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, tendo acesso livre a água e ração. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP, conforme o protocolo número 4702-1/2017, garantindo o cumprimento das diretrizes éticas para experimentação animal.

Para induzir hemólise intravascular, utilizamos o modelo experimental previamente padronizado por nosso grupo (Henrique Silva et al., 2018), que consiste em duas administrações intraperitoneais de fenilhidrazina (PHZ, 50 mg/kg) em camundongos C57BL/6J, com intervalo de 8 horas entre as doses. A segunda dose de PHZ foi administrada 8 horas após a primeira. Após 48 horas da primeira injeção, os animais foram submetidos aos experimentos descritos a seguir.

4.2 Parâmetros Hematológicos

O sangue total foi obtido por punção intracardíaca de camundongos anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), coletado em tubos contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) como anticoagulante. A contagem sanguínea foi determinada dentro de 30–60 minutos após a coleta utilizando o equipamento Sysmex XN-3000™ (Sysmex, Kobe, Japão), e a concentração de hemoglobina foi mensurada por método colorimétrico utilizando kit comercial (Hemoglobin Assay Kit – Colorimetric, Cat# ab234046, BioVision-Abcam, California, EUA).

4.3 Preparação da musculatura lisa cavernosa

Os animais foram eutanasiados por overdose de isoflurano (12%). O pênis foi removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit na seguinte composição (mM): NaCl, 130; NaHCO₃, 14.9; dextrose, 5.5; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.18; MgSO₄·7H₂O, 1.17 e CaCl₂·2H₂O, 1.6. Após a remoção da veia dorsal, uretra, tecidos conectivos e glânde peniana, os corpos cavernosos foram isolados a partir da extremidade proximal após secção do septo fibroso que os conecta. Desta forma, dois segmentos de corpo cavernoso (1.0 x 0.3 x 0.2 cm) foram obtidos de cada animal (Silva et al., 2014).

Os corpos cavernosos foram montados em banhos para órgão isolado (7 mL) preenchidas com a solução Krebs-Henseleit, continuamente aerada com O₂:CO₂ (95:5%) e mantida à temperatura de 37°C (pH 7.4). Os segmentos dos tecidos foram então suspensos entre um transdutor de força e uma unidade fixa. A tensão aplicada aos tecidos (2,5 mN para os corpos cavernosos) foi ajustada a cada 15 minutos assim como a solução de Krebs-Henseleit foi trocada a cada ajuste até estabilização (60 min). As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) e registradas em sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados (software versão 7.0, AD Instruments, Austrália). Este método foi reproduzido de estudo anterior realizado pelo nosso grupo (SILVA, F.H; ANTUNES, E., 2014).

4.4 Curva concentração-resposta

Para analisar a resposta relaxante dos corpos cavernosos, realizou-se a pré-contracção tecidual com o agonista α 1-adrenérgico, fenilefrina (10 μ M). Após a estabilização da resposta contrátil, foram construídas curvas concentração-resposta ao agonista muscarínico, acetilcolina (ACh; 1 nM -10 μ M). As curvas concentração-resposta foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações da droga em questão em meia unidade logarítmica (SILVA, F.H; ANTUNES, E., 2014).

A resposta relaxante foi calculada em relação à contracção máxima produzida pela fenilefrina (10 μ M), a qual foi tomada como 100%. Os valores de potência (pEC₅₀) e resposta máxima (E_{max}) foram calculados utilizando-se o programa GraphPadPrism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4.5 Estimulação elétrica

Para o estudo da estimulação elétrica (EFS), os corpos cavernosos foram montados entre dois eletrodos de platina dispostos de forma paralela. Os tecidos foram estimulados eletricamente a uma voltagem de 20 V, com duração dos pulsos de 1 milissegundo, intervalo entre os pulsos de 0,2 ms, com duração da estimulação de 10 segundos nas frequências de 2, 4, 8, 16 e 32 Hz com intervalo de 1 minutos entre os estímulos.

As respostas relaxantes à EFS (2-32 Hz) foram obtidas em tecidos previamente tratados por 30 min com guanetidina (30 μ M) para depletar os estoques de noradrenalina, e atropina (1 μ M) para bloquear a resposta muscarínica. Em seguida, os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M), após o qual realizou-se a curva frequência-resposta (2-32 Hz).

4.6 Inibidor da Heme Oxigenase

Para analisar a resposta do inibidor da heme oxigenase no relaxamento dos corpos cavernosos induzido pela ACh e pela EFS, o tecido foi pré-incubado com 1J (10 μ M). Após a estabilização da resposta contrátil, foram construídas curvas concentração-resposta ao agonista muscarínico, acetilcolina (ACh; 1 nM -10 μ M). As curvas concentração-resposta foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações da droga em questão em meia unidade logarítmica.

Para análise da estimulação elétrica, os tecidos foram estimulados eletricamente a uma voltagem de 20 V, com duração dos pulsos de 1 milissegundo, intervalo entre os pulsos de 0,2 ms, com duração da estimulação de 10 segundos nas frequências de 2, 4, 8, 16 e 32 Hz com intervalo de 1 minutos entre os estímulos.

Os valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) foram calculados utilizando-se o programa GraphPadPrism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4.7 Western Blotting

As proteínas do corpo cavernoso foram separadas por eletroforese em gel pré-moldado Mini-PROTEAN® TGX™ a 4–20% de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE; Cat# 4561094, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de PVDF, utilizando um sistema de transferência submerso. Para minimizar ligações inespecíficas das proteínas à membrana, realizou-se uma pré-incubação da membrana com um tampão de bloqueio contendo 5% de leite em pó, Tris 10 mM, NaCl 100 mM e 0,02% de Tween 20 por uma hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos para NOX-2, 4-HNE, 3-NT, PDE5, HO-1 e NOX-2 por 15 a 18 horas a 4°C. Após a incubação, as membranas foram lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos secundários. As bandas imunorreativas foram então visualizadas utilizando um kit de quimiluminescência (ECL).

4.8 Determinação dos níveis de GMPc

Para a determinação dos níveis de GMPc em homogenatos de corpos cavernosos de camundongos, os tecidos foram equilibrados durante 20 min em solução de Krebs continuamente oxigenada à 37°C. Em seguida, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, pulverizados, homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA, 5%) e centrifugados à 1500 g por 10 min à 4 °C. O TCA foi extraído das amostras através de três lavagens com solução de éter saturado com água. A preparação do tracer, amostras, padrões e incubação com anticorpo foram feitos conforme descrito no kit disponível comercialmente (Cayman Chemical Cyclic GMP EIA kit, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata e o peso do pellet foi utilizado para normalizar os dados que foram expressos em pmol/mg de tecido.

4.9 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M.), sendo o número de experimentos indicados em cada caso. Para comparações múltiplas entre 4

grupos, foi usado o teste de análise de variância (ANOVA-uma via), seguido pelo teste de *Tukey*. Para comparação entre 2 grupos, usou-se o Teste t de *Student* não pareado. O programa GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, San Diego, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros Hematológicos em Camundongos Tratados com PHZ

Os parâmetros hematológicos dos camundongos tratados com PHZ após 2 dias exibiu uma redução significativa ($p < 0,05$) nos valores de eritrócitos (Figura 8A), hemoglobina total (Figura 8C) e hematócrito (Figura 8B), comparado ao grupo controle, indicando um estado de grave anemia. Os valores de hemoglobina plasmática foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos grupos PHZ em comparação com o grupo controle (Figura 8D), caracterizando o modelo de hemólise intravascular.

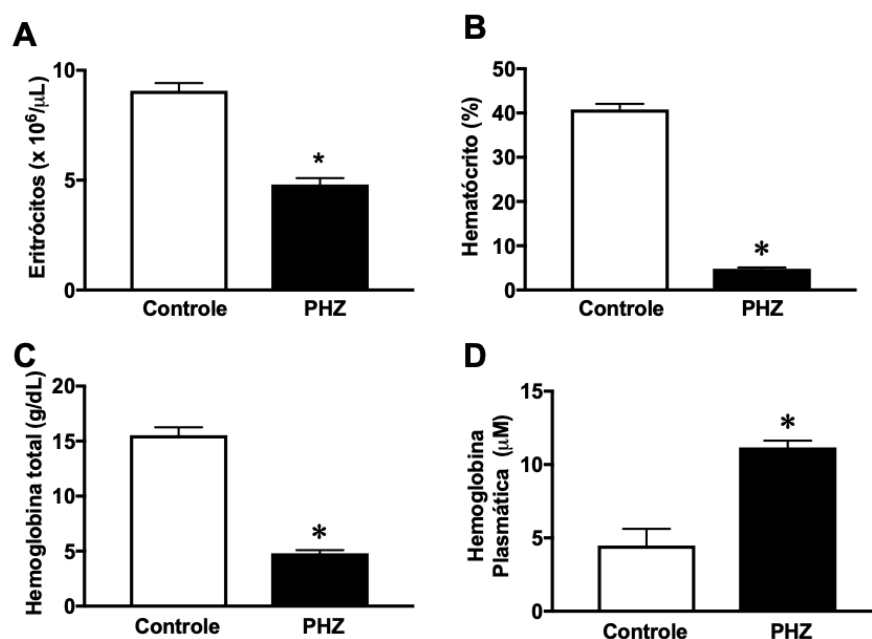


FIGURA 8 - Parâmetros Hematológicos em Camundongos Tratados com PHZ. (A) eritrócitos, (B) hematócrito, (C) hemoglobina total e (D) hemoglobina plasmática. Os dados são mostrados como média $\pm$ E.P.M. de 8 camundongos por grupo. * $p < 0,05$ vs. grupo controle. Teste t de Student não pareado.

5.2. A hemólise intravascular aumenta o relaxamento de corpos cavernosos

O relaxamento do endotélio foi avaliado através da análise de curvas concentração-resposta para ACh (1 nM -10 μ M) em corpo cavernoso de camundongos pré-contraído com fenilefrina (10 μ M) (Figura 9A). A hemólise intravascular aumentou ($p < 0,05$) os valores da resposta máxima de ACh (E_{max}) no grupo PHZ (79 $\pm$ 6) em comparação com o grupo controle (60 $\pm$ 6). A potência (pEC_{50}) da ACh não foi modificada entre o grupo PHZ (6,84 $\pm$ 0,02) e o grupo controle (6,76 $\pm$ 0,03). Os relaxamentos nitrérgicos foram avaliados no corpo cavernoso pré-contraído com fenilefrina (10 μ M). A EFS induziu relaxamento frequência-dependente (2–32Hz) nos grupos controle e PHZ. O relaxamento nitrérgico foi significativamente maior no corpo cavernoso do grupo PHZ em comparação com o grupo controle, exclusivamente nas frequências de 16 e 32 Hz (Figura 9B).

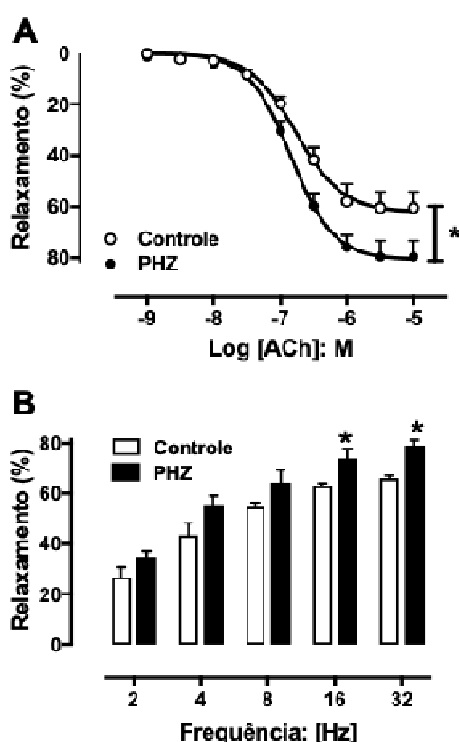


FIGURA 9 – Curvas concentração-resposta para acetilcolina e frequência resposta a estimulação elétrica em corpos cavernosos de camundongos. (A) Curvas concentração-resposta para ACh e (B) respostas de relaxamento ao EFS em fragmentos de corpo cavernoso de camundongos controle e PHZ. Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. de 6 camundongos por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo controle. # $p < 0,05$. Teste t de Student não pareado.

5.3. Efeito da hemólise intravascular na expressão proteica de PDE5 e heme oxigenase-1 em corpo cavernoso de camundongo

A expressão proteica da PDE5 não foi modificada no corpo cavernoso do grupo PHZ em comparação com o grupo controle (Figura 10A). Em contrapartida a expressão proteica de HO-1 foi 76% maior no corpo cavernoso do grupo PHZ em comparação com o grupo controle (Figura 10B).

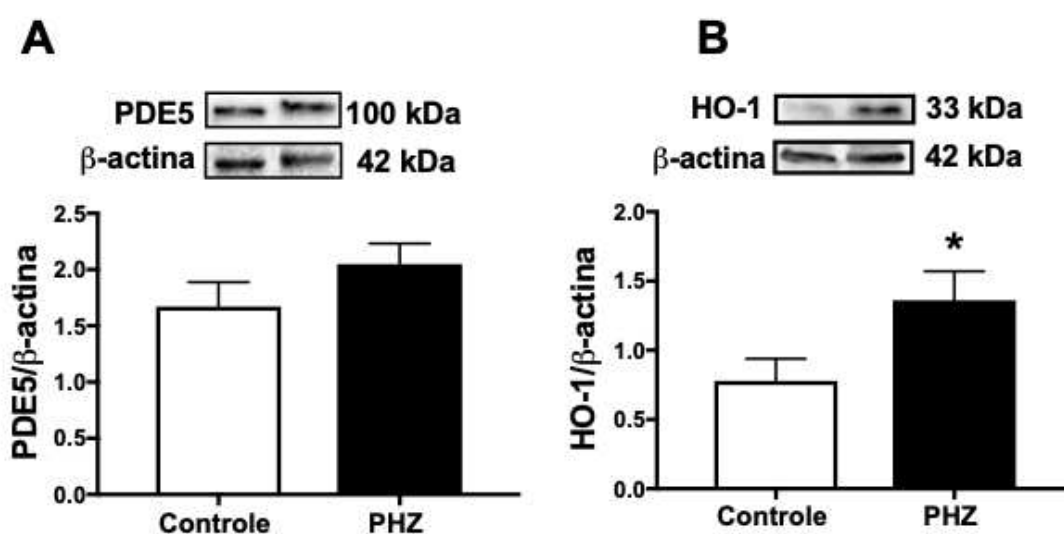


FIGURA 10 - Expressão proteica de PDE5 e heme oxigenase-1 em corpo cavernoso de camundongo. Imagens representativas de western blotting (painéis superiores) e quantificação das respectivas proteínas (painéis inferiores) para (A) PDE5 (n = 9) e (B) HO-1 (n = 8) em homogeneizados de corpo cavernoso de camundongos dos grupos controle e tratados com PHZ. Os dados são mostrados como média ± E.P.M. Teste t de Student não pareado.

5.4. Inibidor da heme oxigenase corrige aumento do relaxamento do corpo cavernoso do camundongo PHZ

A pré-incubação dos corpos cavernosos de camundongos com o inibidor da heme oxigenase-1, composto J (10 μM), não resultou em alterações significativas no tônus basal do tecido, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com PHZ.

A pré-incubação de corpos cavernosos de camundongos com o inibidor de heme oxigenase 1 J (10 μ M; Figura 11A) reduziu os valores Emax de ACh no grupo PHZ + 1 J (61 $\pm$ 4) comparado ao grupo PHZ (80 $\pm$ 6), sem alterações nos valores de pEC50 (6,74 $\pm$ 0,02 e 6,80 $\pm$ 0,03, respectivamente). A indução nitrérgica de relaxamento do corpo cavernoso também foi reduzida pela pré-incubação com o inibidor de heme oxigenase-1 J (10 μ M) no grupo PHZ + 1 J (Figura 11B) comparado ao grupo PHZ. A pré-incubação de corpos cavernosos de camundongos com o inibidor da heme oxigenase-1 J também não alterou o Emax (57 $\pm$ 5) e pEC50 de ACh (6,73 $\pm$ 0,03) no grupo controle, bem como no relaxamento nitrérgico (Figura 11B).

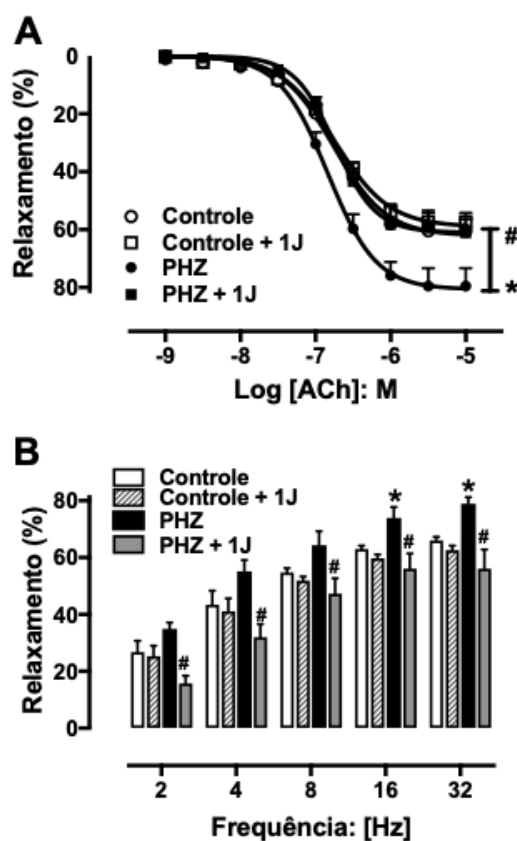


FIGURA 11 – Curvas concentração resposta para acetilcolina e frequência resposta para EFS em corpos cavernosos de camundongos pré incubados com inibidor da heme oxigenasse. (A) Curvas xoncentração-resposta para ACh e (B) respostas de relaxamento ao EFS em fragmentos de corpo cavernoso de camundongos controle e PHZ na ausência ou presença de 1 J (10^{-5} M). Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. de 6 camundongos por grupo. *p < 0,05 vs grupo de controle. #p < 0,05 vs. grupo PHZ. Análise estatística realizada por ANOVA, seguida do teste de Tukey.

5.5. Efeito da hemólise intravascular na expressão proteica de N3ADPH subunidade oxidase NOX-2 e marcadores de estresse oxidativo

A expressão proteica de NOX-2 (Figura 12A), 3-NT (Figura 12B) e 4-HNE (Figura 12C) foi significativamente superior (p < 0,05) em aproximadamente 40%, 43% e 53% no corpo cavernoso do grupo PHZ em comparação com o controle.

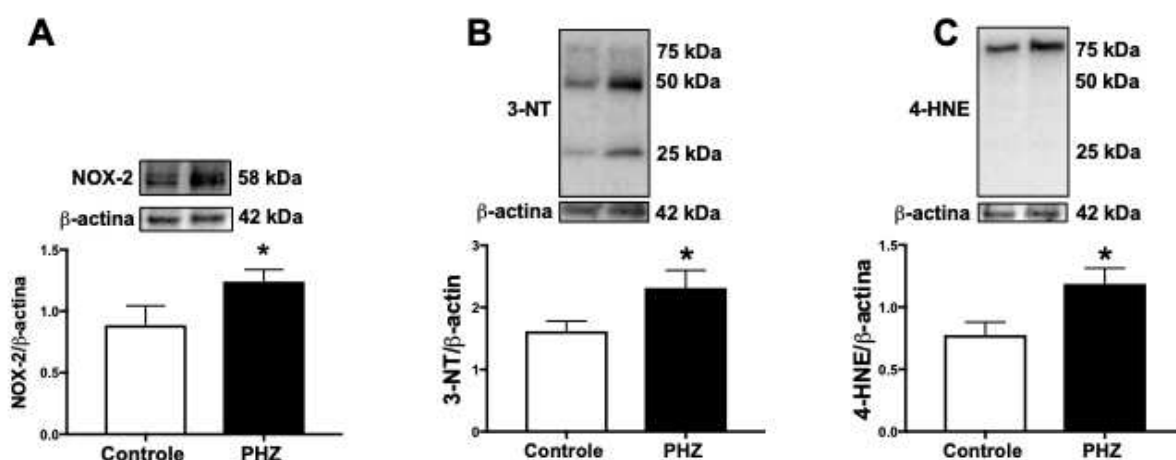


FIGURA 12 – Expressão proteica de N3ADPH subunidade oxidase NOX-2 e marcadores de estresse oxidativo em corpos cavernosos de camundongos. Imagens representativas de western blotting (painéis superiores) e valores de proteína (painéis inferiores) para (A) NOX-2 (n = 4–5) (B) 3-NT (n = 9) e (C) 4-HNE (n = 9) em homogeneizados do corpo cavernoso de camundongos controle e PHZ. Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. *p < 0,05 vs. grupo controle. Teste t de Student não pareado.

5.6. Efeito da hemólise intravascular nos níveis de GMPc em corpo cavernoso de camundongos

O conteúdo basal de GMPc no corpo cavernoso foi 35% menor ($p < 0,05$) no grupo PHZ em comparação com camundongos do grupo controle (Figura 13).

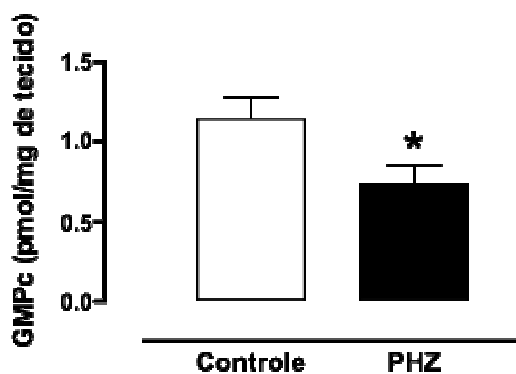


FIGURA 13 - Efeito da hemólise intravascular nos níveis de GMPc em corpo cavernoso de camundongos. Conteúdo basal de GMPc do corpo cavernoso de os grupos controle e PHZ. Os dados são mostrados como média $\pm$ E.P.M. de 6 camundongos por grupo. * $p < 0,05$ vs. grupo controle. Teste t de Student não pareado.

6. DISCUSSÃO

A fisiopatologia da anemia falciforme (AF) é complexa, e uma das alterações iniciais observadas é a hemólise intravascular. A hemólise intravascular, com o consequente aumento dos níveis de hemoglobina livre, parece desempenhar um papel importante nas alterações da função erétil, como o priapismo. Para investigar especificamente o papel da hemólise intravascular nessas disfunções, foi empregado um modelo murino de hemólise intravascular induzida por PHZ. Devido aos camundongos tratados com PHZ apresentaram aumento significativo nos níveis de hemoglobina plasmática em comparação com o grupo controle, confirmou-se a ocorrência de hemólise intravascular (Henrique Silva et al., 2018; Russo et al., 2025).

A ereção peniana, sob condições fisiológicas, é iniciada pela liberação de NO do endotélio e é mantida tanto pelo NO liberado do endotélio quanto por fibras nitrérgicas (Hurt et al., 2012). O NO produzido difunde-se para o músculo liso dos corpos cavernosos e ativa a GCs, gerando o segundo mensageiro GMPc que, por sua vez, ativa uma proteína quinase dependente de GMPc, que atua nos mecanismos de indução de relaxamento muscular e a ereção peniana (Hurt et al., 2012). Em nosso estudo, avaliamos inicialmente a resposta do relaxamento endotélio-dependente do corpo cavernoso induzido pelo agonista muscarínico e o relaxamento nitrérgico induzido pela EFS. A hemólise intravascular aumentou a resposta relaxante à ACh no corpo cavernoso do grupo PHZ, bem como relaxamento nitrérgico. Semelhante aos nossos resultados, estudos anteriores relataram que camundongos modelos de anemia falciforme exibem uma resposta relaxante excessiva do corpo cavernoso induzida por ACh e EFS (Silva et al., 2016b).

A enzima PDE5 é a enzima responsável por metabolizar GMPc no pênis. Inibidores da PDE5 aumentam os níveis intracelulares de GMPc, e aumentam o relaxamento NO-dependente no corpo cavernoso, como consequência, a ereção é facilitada (Carson; Lue, 2005). Em camundongos modelos de anemia falciforme, o aumento do relaxamento induzido por ACh e EFS (relaxamento nitrérgico) no corpo cavernoso foi associado à redução da atividade de PDE5 e a expressão proteica reduzida (Musicki et al., 2022; Silva et al., 2016b, 2016c). Camundongos falciformes quiméricos gerados a partir do transplante de medula óssea de camundongos falciformes transgênicos de Berkeley também apresentam hemólise associada à resposta erétil exagerada e regulação negativa de PDE5 (Sopko et al., 2015). Estudos pré-clínicos demonstraram que o tratamento com agentes terapêuticos em investigação que aumentam a

biodisponibilidade do NO restaura relaxamento do corpo cavernoso devido à normalização da expressão da proteína PDE5 no pênis (Musicki et al., 2022; Pereira et al., 2022; Silva et al., 2016b). Em nosso estudo, levantamos a hipótese que o relaxamento exagerado do corpo cavernoso em resposta à ACh e EFS no grupo PHZ também poderia estar associado à expressão reduzida de PDE5 no pênis. No entanto, não observamos nenhuma mudança significativa na expressão da proteína PDE5 no corpo cavernoso do Grupo PHZ. Essas descobertas indicam que o relaxamento exacerbado do corpo cavernoso não pode ser atribuído à diminuição da degradação de GMPc pela PDE5 no grupo PHZ.

Embora inicialmente tenhamos investigado a contribuição da PDE5 para o relaxamento exacerbado do corpo cavernoso no grupo PHZ, a ausência de alterações em sua expressão sugere a participação de outros mecanismos. Nesse contexto, a hemólise induzida pela fenilhidrazina e a consequente liberação de hemoglobina e heme no plasma emergem como potenciais fatores moduladores da função erétil (Idris; Burnett; DeBaun, 2022b). O processo de hemólise intravascular libera altas concentrações de hemoglobina no plasma que é rapidamente oxidada (Ahmed; Ghatge; Safo, 2020; Reiter et al., 2002). A hemoglobina oxidada libera o grupo heme no plasma (Ahmed; Ghatge; Safo, 2020; Reiter et al., 2002) e, consequentemente, os pacientes com AF apresentam níveis plasmáticos elevados de heme (Vendrame et al., 2018). O grupo heme é metabolizado por HO-1 (induzível) e HO-2 (constitutivo), gerando CO, biliverdina e ferro (Gbotosho; Kapetanaki; Kato, 2021; Ryter; Alam; Choi, 2006a). Como o grupo heme é o indutor mais poderoso de HO-1, (Gbotosho; Kapetanaki; Kato, 2021; Ryter; Alam; Choi, 2006b) nós avaliamos a expressão desta enzima no corpo cavernoso do grupo PHZ. De fato, a expressão de HO-1 apresentou níveis elevados no corpo cavernoso do grupo PHZ. CO é conhecido por ativar o GCs (Ryter, 2022; Stone; Marletta, 1994) e induzir o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso (Ushiyama et al., 2004) e artérias (Ryter, 2022; Mustafa; Gadalla; Snyder, 2009; Wang; Wang; Wu, 1997). É provável que o CO gerado pelo HO-1 pode estar contribuindo para o aumento do relaxamento do corpo cavernoso induzido por ACh e EFS no grupo PHZ. Portanto, a inibição da HO-1 poderia ser uma possível estratégia para prevenir a liberação de CO (Salerno et al., 2019; Sorrenti et al., 2012). Em nosso estudo, um inibidor seletivo de HO-1 normalizou o relaxamento do corpo cavernoso no grupo PHZ, indicando que HO-1 contribui para o relaxamento tecidual excessivo. Esses achados estão em concordância com estudos prévios que demonstram que o heme induz o relaxamento vascular, efeito que pode ser revertido pela inibição da HO-1. (Ahmed et al., 2000).

Sob condições patológicas, a oxidação do NADPH é a principal fonte de ânion superóxido. NADPH oxidase é formado por subunidades, NOX-2 é a subunidade catalítica que transfere um elétron para o oxigênio, gerando assim o ânion superóxido (Koju; Qin; Sheng, 2022; Orrico et al., 2023; Schröder, 2020). A baixa biodisponibilidade de NO em camundongos geneticamente modificados para eNOS e nNOS causam aumento do estresse oxidativo associado a expressão aumentada da proteína NOX-2 no pênis (Silva et al., 2016b). Estudos anteriores mostraram que a expressão NOX-2 é regulado negativamente por um mecanismo dependente de GMPc (Nunes et al., 2015; Teixeira; Priviero; Webb, 2007). A fisiopatologia do priapismo tem sido associada ao aumento do estresse oxidativo e ao aumento da atividade de NADPH oxidase (Lagoda et al., 2013; Musicki et al., 2012; Silva et al., 2016b). Em nosso estudo, a expressão de NOX-2 apresentou níveis elevados nos corpos cavernosos do grupo PHZ. O excesso de ânion superóxido gerado pela NADPH oxidase pode reagir com NO, formando peroxinitrito que é uma espécie reativa de nitrogênio extremamente tóxica. A expressão de 3-NT e 4-HNE é usado como marcador de reação de espécies de nitrogênio ou EROs, respectivamente. De acordo com o resultado do NOX-2, a expressão de 3-NT e 4-HNE apresentam níveis elevados no corpo cavernoso do grupo PHZ. Portanto, neste contexto, é razoável sugerir que a biodisponibilidade reduzida de NO causada pelo excesso de hemoglobina plasmática pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo no pênis. Em nosso estudo, os níveis basais de GMPc foram mais baixos no corpo cavernoso do grupo PHZ, indicando que a redução da biodisponibilidade do NO pode ser causada pelo aumento da produção do ânion superóxido, além da reação de NO com a hemoglobina plasmática.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados mostram que a hemólise intravascular promove aumento do relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso associado ao aumento da expressão de HO-1. A hemólise intravascular também causou aumento do estresse oxidativo associado à regulação positiva da expressão de NOX-2. No geral, nosso estudo indica que a hemólise intravascular promove alterações no pênis semelhantes a observadas nos pênis de pacientes e camundongos com anemia falciforme. O presente estudo também confirma estudos clínicos que apontam para uma forte correlação positiva entre priapismo e altos níveis de hemólise intravascular em homens com anemia falciforme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRASHEV, Hristo *et al.* A Systematic Review of Endothelial Dysfunction in Chronic Venous Disease—Inflammation, Oxidative Stress, and Shear Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 8, p. 3660, 12 abr. 2025.
- AHMED, Asif *et al.* Induction of Placental Heme Oxygenase-1 Is Protective Against TNF α -induced Cytotoxicity and Promotes Vessel Relaxation. 2000.
- AHMED, Mostafa H.; GHATGE, Mohini S.; SAFO, Martin K. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. In: HOEGER, Ulrich; HARRIS, J. Robin (Orgs.). **Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins**. Subcellular Biochemistry. Cham: Springer International Publishing, 2020. v. 94 p. 345–382.
- AHUJA, Geeta *et al.* Priapism and Sickle Cell Disease: Special Considerations in Etiology, Management, and Prevention. **Urology**, v. 156, p. e40–e47, out. 2021.
- AKAKPO, William; BURNETT, Arthur L. Update on the prevalence and pathophysiology of sickle cell priapism: a narrative review. **International Journal of Impotence Research**, 11 abr. 2025.
- ALVAIA, Mateus Andrade *et al.* Prevalence of priapism in individuals with sickle cell disease and implications on male sexual function. **Einstein (São Paulo)**, v. 18, p. eAO5070, 16 abr. 2020.
- ANDERSSON, K. E. Mechanisms of Penile Erection and Basis for Pharmacological Treatment of Erectile Dysfunction. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 4, p. 811–859, dez. 2011.
- ANELE, Uzoma; MORRISON, Belinda; BURNETT, Arthur. Molecular Pathophysiology of Priapism: Emerging Targets. **Current Drug Targets**, v. 16, n. 5, p. 474–483, 4 maio 2015.
- BELCHER, John D. *et al.* Heme Degradation and Vascular Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 2, p. 233–248, 15 jan. 2010.
- BIVALACQUA, Trinity J. *et al.* Establishment of a transgenic sickle-cell mouse model to study the pathophysiology of priapism. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 6, n. 9, p. 2494–2504, set. 2009.
- BUEHLER, Paul W.; HUMAR, Rok; SCHAEER, Dominik J. Haptoglobin Therapeutics and Compartmentalization of Cell-Free Hemoglobin Toxicity. **Trends in Molecular Medicine**, v. 26, n. 7, p. 683–697, jul. 2020.
- BURNETT, Arthur L.; BIVALACQUA, Trinity J. Priapism: Current Principles and Practice. **Urologic Clinics of North America**, v. 34, n. 4, p. 631–642, nov. 2007.
- CARSON, Culley C.; LUE, Tom F. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. **BJU International**, v. 96, n. 3, p. 257–280, ago. 2005.
- CHAMPION, Hunter C. *et al.* Phosphodiesterase-5A dysregulation in penile erectile tissue is a mechanism of priapism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 5, p. 1661–1666, fev. 2005.
- CHOI, Yoon Kyung; KIM, Young-Myeong. Beneficial and Detrimental Roles of Heme Oxygenase-1 in the Neurovascular System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 7041, 24 jun. 2022.
- CITA, Kizzy-Clara *et al.* Men with Sickle Cell Anemia and Priapism Exhibit Increased Hemolytic Rate, Decreased Red Blood Cell Deformability and Increased Red Blood Cell Aggregate Strength. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0154866, 4 maio 2016.

CORBIN, Jackie D. *et al.* Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 9, p. 2760–2767, maio 2000.

DE NIRO, Agustin J. Nanda *et al.* Predictors of priapism incidence and recurrence in sickle cell disease patients. **African Journal of Urology**, v. 29, n. 1, p. 45, 14 set. 2023.

DEAN, Robert C.; LUE, Tom F. Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. **The Urologic clinics of North America**, v. 32, n. 4, p. 379–v, nov. 2005.

DRAKE, Richard L.; VOGL, Wayne; MITCHELL, Adam W. M. **Gray - Anatomia Clínica para Estudantes**. 4. ed. [S.l.: S.n.].

DUTRA, Fabianno F. *et al.* Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 39, p. E4110–4118, 30 set. 2014.

ELENDU, Chukwuka *et al.* Understanding Sickle cell disease: Causes, symptoms, and treatment options. **Medicine**, v. 102, n. 38, p. e35237, 22 set. 2023.

FREY, Randall S.; USHIO–FUKAI, Masuko; MALIK, Asrar B. NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 4, p. 791–810, abr. 2009.

GALIZA NETO, Gentil Claudino De; PITOMBEIRA, Maria Da Silva. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, 2003.

GBOTOSHO, Oluwabukola T.; KAPETANAKI, Maria G.; KATO, Gregory J. The Worst Things in Life are Free: The Role of Free Heme in Sickle Cell Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 27 jan. 2021.

GOLDSTEIN, Bernard D.; ROZEN, Michael G.; KUNIS, Richard L. Role of red cell membrane lipid peroxidation in hemolysis due to phenylhydrazine. **Biochemical Pharmacology**, v. 29, n. 10, p. 1355–1359, maio 1980.

GRAAFF, KMVD. **Anatomia Humana**. 6. ed. [S.l.]: Editora Manole, 2003.

GUTIERREZ, Mario *et al.* Characterizing bulk rigidity of rigid red blood cell populations in sickle-cell disease patients. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 7909, 12 abr. 2021.

HENRIQUE SILVA, Fabio *et al.* Impairment of Nitric Oxide Pathway by Intravascular Hemolysis Plays a Major Role in Mice Esophageal Hypercontractility: Reversion by Soluble Guanylyl Cyclase Stimulator. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 367, n. 2, p. 194–202, nov. 2018.

HSIEH, Cheng-Hsing *et al.* Advances in understanding of mammalian penile evolution, human penile anatomy and human erection physiology: clinical implications for physicians and surgeons. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 18, n. 7, p. RA118–125, jul. 2012.

HUDNALL, Matthew; REED-MALDONADO, Amanda B.; LUE, Tom F. Advances in the understanding of priapism. **Translational Andrology and Urology**, v. 6, n. 2, p. 199–206, abr. 2017.

HURT, K. Joseph *et al.* Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 6, p. 4061–4066, 19 mar. 2002.

- HURT, K. Joseph *et al.* Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 41, p. 16624–16629, 9 out. 2012.
- IDRIS, Ibrahim M. *et al.* Men with sickle cell disease experience greater sexual dysfunction when compared with men without sickle cell disease. **Blood Advances**, v. 4, n. 14, p. 3277–3283, 28 jul. 2020.
- IDRIS, Ibrahim M.; BURNETT, Arthur L.; DEBAUN, Michael R. Epidemiology and treatment of priapism in sickle cell disease. **Hematology**, v. 2022, n. 1, p. 450–458, 9 dez. 2022a.
- IDRIS, Ibrahim M.; BURNETT, Arthur L.; DEBAUN, Michael R. Epidemiology and treatment of priapism in sickle cell disease. **Hematology**, v. 2022, n. 1, p. 450–458, 9 dez. 2022b.
- IGNARRO, Louis J. Haem-Dependent Activation of Guanylate Cyclase and Cyclic GMP Formation by Endogenous Nitric Oxide: A Unique Transduction Mechanism for Transcellular Signaling. **Pharmacology & Toxicology**, v. 67, n. 1, p. 1–7, jul. 1990.
- ITANO, Harvey A.; HIROTA, Kazuhiro; HOSOKAWA, Keimei. Mechanism of induction of haemolytic anaemia by phenylhydrazine. **Nature**, v. 256, n. 5519, p. 665–667, ago. 1975.
- JIN, Yong Chun *et al.* Expression and Activity of Heme Oxygenase-1 in Artificially Induced Low-Flow Priapism in Rat Penile Tissues. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 5, n. 8, p. 1876–1882, 1 ago. 2008.
- KATO, Gregory J. *et al.* Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18010, 15 mar. 2018.
- KATO, Gregory J.; STEINBERG, Martin H.; GLADWIN, Mark T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 1 mar. 2017.
- KOJU, Nirmala; QIN, Zheng-hong; SHENG, Rui. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in redox balance and diseases: a friend or foe? **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 43, n. 8, p. 1889–1904, ago. 2022.
- KRISTIANSEN, Mette *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor. v. 409, 2001.
- LAGODA, Gwen *et al.* Molecular Analysis of Erection Regulatory Factors in Sickle Cell Disease Associated Priapism in the Human Penis. **Journal of Urology**, v. 189, n. 2, p. 762–768, fev. 2013.
- LIM, S. K. *et al.* Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis. **Blood**, v. 92, n. 6, p. 1870–1877, 15 set. 1998.
- MACDONALD, Susan M.; BURNETT, Arthur L. Physiology of Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. **Urologic Clinics of North America**, v. 48, n. 4, p. 513–525, nov. 2021.
- MENON, Archita Venugopal *et al.* Excess heme upregulates heme oxygenase 1 and promotes cardiac ferroptosis in mice with sickle cell disease. **Blood**, v. 139, n. 6, p. 936–941, 10 fev. 2022.
- MIGOTSKY, Michael; BEESTRUM, Molly; BADAWEY, Sherif M. Recent Advances in Sickle-Cell Disease Therapies: A Review of Voxelotor, Crizanlizumab, and L-glutamine. **Pharmacy**, v. 10, n. 5, p. 123, 26 set. 2022.
- MITIDIERI, Emma *et al.* Pharmacology and perspectives in erectile dysfunction in man. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 208, p. 107493, abr. 2020.
- MIZUSAWA, H.; ISHIZUKA, O.; NISHIZAWA, O. Animal models for studying penile hemodynamics. p. 225–8, set. 2002.

- MÖLLER, Matias N. *et al.* Oxidants and Antioxidants in the Redox Biochemistry of Human Red Blood Cells. **ACS Omega**, v. 8, n. 1, p. 147–168, 10 jan. 2023.
- MONTAGUE, Drogo K. *et al.* American Urological Association Guideline On The Management of Priapism. **Journal of Urology**, v. 170, n. 4 Part 1, p. 1318–1324, out. 2003.
- MONTEIRO, Ana Carolina Borges *et al.* ANEMIA FALCIFORME, UMA DOENÇA CARACTERIZADA PELA ALTERAÇÃO NO FORMATO DAS HEMÁCIAS. **Saúde em Foco**, 2015.
- MOORE, Keith L.; DALLEY, Arthur F.; AGUR, Anne M. R. **Anatomia Orientada para Clínica**. 8. ed. [S.l.]: Grupo GEN, 2018.
- MOREAU, Robert *et al.* Alterations in bone and erythropoiesis in hemolytic anemia: comparative study in bled, phenylhydrazine-treated and Plasmodium-infected mice. **PloS One**, v. 7, n. 9, p. e46101, 2012.
- MULLER-EBERHARD, U. *et al.* Brief Report: Plasma Concentrations of Hemopexin, Haptoglobin and Heme in Patients with Various Hemolytic Diseases. **Blood**, v. 32, n. 5, p. 811–815, 1 nov. 1968.
- MUSICKI, B. *et al.* Testosterone replacement in transgenic sickle cell mice controls priapic activity and upregulates PDE5 expression and eNOS activity in the penis. **Andrology**, v. 6, n. 1, p. 184–191, jan. 2018.
- MUSICKI, Biljana *et al.* Targeting NADPH Oxidase Decreases Oxidative Stress in the Transgenic Sickle Cell Mouse Penis. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1980–1987, ago. 2012.
- MUSICKI, Biljana *et al.* TSPO ligand FGIN-1-27 controls priapism in sickle cell mice via endogenous testosterone production. 2022.
- MUSICKI, Biljana; ARTHUR L. BURNETT. Mechanisms underlying priapism in sickle cell disease: targeting and key innovations on the preclinical landscape. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 24, n. 5, p. 439–450, 3 maio 2020.
- MUSTAFA, Asif K.; GADALLA, Moataz M.; SNYDER, Solomon H. Signaling by Gasotransmitters. **Science Signaling**, v. 2, n. 68, 28 abr. 2009.
- NAGEL, Ronald L.; GIBSON, Quentin H. The Binding of Hemoglobin to Haptoglobin and Its Relation to Subunit Dissociation of Hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 1, p. 69–73, jan. 1971.
- NKYA, Siana *et al.* Update on SickleInAfrica: a collaborative and multidimensional approach to conduct research and improve health. **The Lancet Haematology**, v. 11, n. 8, p. e565–e566, ago. 2024.
- NOLAN, Vikki G. *et al.* Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3264–3267, 1 nov. 2005.
- NUNES, Kenia Pedrosa *et al.* Beneficial Effect of the Soluble Guanylyl Cyclase Stimulator BAY 41-2272 on Impaired Penile Erection in db/db ^{-/-} Type II Diabetic and Obese Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 353, n. 2, p. 330–339, maio 2015.
- ORRICO, Florencia *et al.* Oxidative Stress in Healthy and Pathological Red Blood Cells. **Biomolecules**, v. 13, n. 8, p. 1262, 18 ago. 2023.
- OVALLE, William. **Netter Bases da Histologia**. 2. ed. [S.l.]: Grupo GEN, 2014.

PÁSZTY, C. *et al.* Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 278, n. 5339, p. 876–878, 31 out. 1997.

PEREIRA, Pamela Da Silva *et al.* Haptoglobin treatment contributes to regulating nitric oxide signal and reduces oxidative stress in the penis: A preventive treatment for priapism in sickle cell disease. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 961534, 13 set. 2022.

RABÊLO, Luiza A. *et al.* Desbalanço redox: NADPH oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 5, p. 684–693, maio 2010.

REES, David C.; WILLIAMS, Thomas N.; GLADWIN, Mark T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, dez. 2010.

REIS, Joana Pereira Dos. **Disfunção erétil: Etiologia, Diagnóstico e Tratamento**. Coimbra: FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA, mar. 2012.

REITER, Christopher D. *et al.* Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nature Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1383–1389, dez. 2002.

RUSSO, Annamaria *et al.* Crosstalk Between Sickle Cell Disease and Ferroptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 8, p. 3675, 13 abr. 2025.

RYTER, Stefan W. Heme Oxygenase-1: An Anti-Inflammatory Effector in Cardiovascular, Lung, and Related Metabolic Disorders. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 555, 15 mar. 2022.

RYTER, Stefan W.; ALAM, Jawed; CHOI, Augustine M. K. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 583–650, abr. 2006a.

RYTER, Stefan W.; ALAM, Jawed; CHOI, Augustine M. K. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 583–650, abr. 2006b.

SALERNO, Loredana *et al.* Progress in the development of selective heme oxygenase-1 inhibitors and their potential therapeutic application. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 439–453, abr. 2019.

SALONIA, Andrea *et al.* European Association of Urology Guidelines on Priapism. **European Urology**, v. 65, n. 2, p. 480–489, fev. 2014.

SANZ, Caroline G.; ALDEA, Anca; BARSAN, Madalina M. Electrochemical detection of superoxide anion in living systems: Recent trends and clinical implications. **Bioelectrochemistry**, v. 165, p. 108998, out. 2025.

SCHAER, Dominik J. *et al.* Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways—basic science, clinical perspectives, and drug development. **Frontiers in Physiology**, v. 5, 28 out. 2014.

SCHRÖDER, Katrin. NADPH oxidases: Current aspects and tools. **Redox Biology**, v. 34, p. 101512, jul. 2020.

SELEMIDIS, S. *et al.* Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 2, p. 349–358, 15 jul. 2007.

SHAMLOUL, Rany. The Potential Role of the Heme Oxygenase/Carbon Monoxide System in Male Sexual Dysfunctions. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 6, n. 2, p. 324–333, 1 fev. 2009.

SHEN, Hui-Hui *et al.* HIF1A-induced heme oxygenase 1 promotes the survival of decidual stromal cells against excess heme-mediated oxidative stress. **Reproduction**, v. 163, n. 1, p. 33–43, 1 jan. 2022.

SHIH, Andrew W. Y.; MCFARLANE, Andrew; VERHOVSEK, Madeleine. Haptoglobin testing in hemolysis: Measurement and interpretation. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 4, p. 443–447, abr. 2014.

SIES, Helmut; JONES, Dean P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 7, p. 363–383, 15 jul. 2020.

SILVA, Fábio H. *et al.* Oxidative stress associated with middle aging leads to sympathetic hyperactivity and downregulation of soluble guanylyl cyclase in corpus cavernosum. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 307, n. 10, p. H1393–H1400, 15 nov. 2014.

SILVA, Fábio H. *et al.* Beneficial Effect of the Nitric Oxide Donor Compound 3-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)Benzyl Nitrate on Dysregulated Phosphodiesterase 5, NADPH Oxidase, and Nitrosative Stress in the Sick Cell Mouse Penis: Implication for Priapism Treatment. **Molecular analysis of erection regulatory factors in sickle cell disease associated priapism in the human penis**, v. 359, n. 2, p. 230–237, nov. 2016a.

SILVA, Fábio H. *et al.* Beneficial Effect of the Nitric Oxide Donor Compound 3-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)Benzyl Nitrate on Dysregulated Phosphodiesterase 5, NADPH Oxidase, and Nitrosative Stress in the Sick Cell Mouse Penis: Implication for Priapism Treatment. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 359, n. 2, p. 230–237, nov. 2016b.

SILVA, Fábio H. *et al.* Sympathetic Hyperactivity, Increased Tyrosine Hydroxylase and Exaggerated Corpus Cavernosum Relaxations Associated with Oxidative Stress Plays a Major Role in the Penis Dysfunction in Townes Sick Cell Mouse. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0166291, 9 dez. 2016c.

SILVA, F.H.; ANTUNES, E. **Role of oxidative stress in erectile dysfunction in middle-aged rats: prevention by antioxidant therapy**. UNICAMP, , 2014.

SIMONSEN, Ulf; GARCÍA-SACRISTÁN, Albino; PRIETO, Dolores. Penile arteries and erection. **Journal of Vascular Research**, v. 39, n. 4, p. 283–303, ago. 2002.

SMITH, Ann; MCCULLOH, Russell J. Hemopexin and haptoglobin: allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders. **Frontiers in Physiology**, v. 6, 30 jun. 2015.

SOLOVEY, Anna *et al.* Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. **Blood**, v. 104, n. 3, p. 840–846, 1 ago. 2004.

SOPKO, Nikolai A. *et al.* Subacute Hemolysis in Sick Cell Mice Causes Priapism Secondary to NO Imbalance and PDE5 Dysregulation. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 12, n. 9, p. 1878–1885, 1 set. 2015.

SORRENTI, Valeria *et al.* Evaluation of Imidazole-Based Compounds as Heme Oxygenase-1 Inhibitors. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 80, n. 6, p. 876–886, dez. 2012.

STONE, James R.; MARLETTA, Michael A. Soluble Guanylate Cyclase from Bovine Lung: Activation with Nitric Oxide and Carbon Monoxide and Spectral Characterization of the Ferrous and Ferric States. **Biochemistry**, v. 33, n. 18, p. 5636–5640, 10 maio 1994.

SUNDD, Prithu; GLADWIN, Mark T.; NOVELLI, Enrico M. Pathophysiology of Sick Cell Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 263–292, 24 jan. 2019.

TEIXEIRA, Cleber E.; PRIVIERO, Fernanda B. M.; WEBB, R. Clinton. Effects of 5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1 *H* -pyrazolo[3,4- *b*]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine (BAY 41-2272) on Smooth Muscle Tone, Soluble Guanylyl Cyclase Activity, and NADPH Oxidase Activity/Expression in Corpus Cavernosum from Wild-Type, Neuronal, and Endothelial Nitric-Oxide Synthase Null Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, n. 3, p. 1093–1102, set. 2007.

THOMSEN, Jens Haugbølle *et al.* The Haptoglobin-CD163-Heme Oxygenase-1 Pathway for Hemoglobin Scavenging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

THOMSON, Azalea M. *et al.* Global, regional, and national prevalence and mortality burden of sickle cell disease, 2000–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. **The Lancet Haematology**, v. 10, n. 8, p. e585–e599, ago. 2023.

USHIYAMA, Masayuki *et al.* Erectile Dysfunction in Hypertensive Rats Results from Impairment of the Relaxation Evoked by Neurogenic Carbon Monoxide and Nitric Oxide. **Hypertension Research**, v. 27, n. 4, p. 253–261, 2004.

VENDRAME, Felipe *et al.* Differences in heme and hemopexin content in lipoproteins from patients with sickle cell disease. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 12, n. 6, p. 1532–1538, nov. 2018.

WANG, Rui; WANG, Zunzhe; WU, Lingyun. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. 1997.

WARE, Russell E. *et al.* Sick cell disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311–323, jul. 2017.

WHYTE, Nichelle; MORRISON-BLIDGEN, Belinda; ASNANI, Monika. Priapism in Sick Cell Disease: An Evaluation of the Knowledge of an at Risk Population in Jamaica. **Sexual Medicine**, v. 9, n. 3, p. 100339–100339, 1 jun. 2021.

WOOD, Katherine C.; HSU, Lewis L.; GLADWIN, Mark T. Sick cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1506–1528, abr. 2008.

WU, Li-Chen *et al.* Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. **Blood**, v. 108, n. 4, p. 1183–1188, 15 ago. 2006.

YIEE, Jenny H.; BASKIN, Laurence S. Penile Embryology and Anatomy. **The Scientific World JOURNAL**, v. 10, p. 1174–1179, 2010.

ZHANG, Lingbo *et al.* ZFP36L2 is required for self-renewal of early burst-forming unit erythroid progenitors. **Nature**, v. 499, n. 7456, p. 92–96, 4 jul. 2013.

ANEXOS



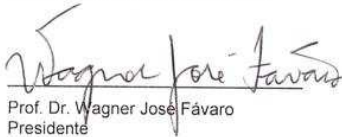
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Priapismo e disfunção miccional na anemia falciforme: fisiopatologia e novos candidatos a fármacos, registrada com o nº 4702-1/2017, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa e Fabio Henrique Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 27 de outubro de 2017.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/10/2017-01/10/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	27/10/2017-01/10/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / Hbatm1(HBA)TowHbbtn2(HBG1,HBB*)Tow/Hbbtn3(HBG1,HBB)Tow/J
No. de animais:	90
Idade/Peso:	03 meses / 30g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	120
Idade/Peso:	03 meses / 30g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Biologia Molecular e Hemostasia, HEMOCENTRO/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 27 de outubro de 2017.


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.